

Epigenetische Regulation der Chondrozytendifferenzierung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für

Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Andrea Maria Thiesen

aus Zell an der Mosel

im August 2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Zentrum für Medizinische Biotechnologie in der Abteilung für Entwicklungsbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachterin: Prof. Dr. Andrea Vortkamp
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Hoffmann
3. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2016

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
TABELLENVERZEICHNIS.....	XI
1 EINLEITUNG.....	12
1.1 DAS SKELETT: KNORPEL UND KNOCHEN	13
1.1.1 <i>Enchondrale Ossifikation</i>	14
1.1.2 <i>Molekulare Regulation der Chondrozytendifferenzierung</i>	16
1.1.3 <i>Skelettale Dysplasie</i>	18
1.1.4 <i>Knochenfehlbildungen durch Mutationen Chondrozyten-spezifischer Gene</i>	19
1.2 EPIGENETISCHE REGULATIONSMECHANISMEN	20
1.2.1 <i>Genregulation durch Histon-modifizierende Enzyme.....</i>	21
1.2.2 <i>Regulative Funktion von Histonmodifikationen</i>	24
1.2.3 <i>Systematische Analyse der Histonmodifikationen</i>	27
1.2.4 <i>Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch Histon-modifizierende Enzyme.....</i>	29
1.3 CHIP-SEQ ZUR IDENTIFIZIERUNG EPIGENETISCHER MARKIERUNGEN	33
2 ZIEL DER ARBEIT	38
3 MATERIAL UND METHODEN	40
3.1 MATERIAL.....	40
3.1.1 <i>Chemikalien.....</i>	40
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	41
3.1.3 <i>Antikörper.....</i>	41
3.1.4 <i>Genotypisierungsprimer</i>	41
3.1.5 <i>Geräte.....</i>	42
3.1.6 <i>Software</i>	43
3.1.7 <i>Puffer und Lösungen</i>	43
3.1 METHODEN.....	45
3.1.1 <i>Zellkultur</i>	45
3.1.2 <i>Charakterisierung transgener Mäuse</i>	46
3.1.3 <i>Zellisolation und ChIP-seq.....</i>	51
3.1.3.1 <i>Analytisches und präparatives FACS (Fluorescence-activated cell</i>	51
3.1.4 <i>ChIP-seq Rohdaten und Peak-Detektion</i>	57
3.1.5 <i>Biologische Auswertungen der ChIP-seq Daten</i>	62
4 ERGEBNIS.....	65

4.1	CHARAKTERISIERUNG DER TRANSGENEN MAUSLINIEN	65
4.1.1	<i>Spezifische Expression von YFP in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten</i>	65
4.1.2	<i>Isolation von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten mittels FACS.....</i>	72
4.2	ANALYTISCHE AUSWERTUNGEN DER CHIP-SEQ DATEN	75
4.2.1	<i>Die ChIP-seq Rohdaten zeigen hohe Read-und Alignment-Qualitäten.....</i>	75
4.2.2	<i>Die Peak-Detektion mit der StrandNGS Software weist mehr Gene durch aktivierende Histonmodifikationen nach.....</i>	83
4.2.3	<i>Hohe Übereinstimmung der durch aktivierende Histonmodifikationen markierten Gene</i>	84
4.2.4	<i>Ein neuer ES Zell-ChIP erweitert die publizierten ES Zell-Daten</i>	87
4.3	BIOLOGISCHE AUSWERTUNG DER CHIP-SEQ DATEN	91
4.3.1	<i>Chondrozyten-spezifische Gene zeigen aktivierende Peaks, welche in ES-Zellen reprimiert sind..</i>	91
4.3.2	<i>Exklusiv aktive Gene in proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten spiegeln den Zelltyp wieder</i>	108
4.3.3	<i>Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch die bivalente Gen-Markierung</i>	114
4.3.4	<i>Genregulation durch Enhancer während der Zelldifferenzierung.....</i>	120
4.3.5	<i>Enhancer-Analyse durch Sox9.....</i>	127
5	DISKUSSION	131
5.1	DIE CHIP-SEQ METHODE UND AUSWERTUNG DER ROHDATEN.....	131
5.1.1	<i>Etablierung eines ChIP-seq-Protokolls für geringe Zellzahlen.....</i>	131
5.1.2	<i>Hohe Read-Qualitäten führen zu einer guten Reproduzierbarkeit der Daten</i>	135
5.1.3	<i>Auswahl der spezifischen Algorithmen zur Peak-Detektion</i>	136
5.2	ES-ZELL CHIP DATEN ERGÄNZEN PUBLIZIERTE ES-ZELL DATEN.....	137
5.3	BIOLOGISCHE AUSWERTUNG	138
5.3.1	<i>Histonmodifikationen zur Enhancer-Analyse</i>	138
5.3.2	<i>Detektion aktivierenden Histonmodifikationen an Zelltyp-spezifischen Genen.....</i>	143
5.3.3	<i>Transkriptionell-aktive Gene zeigen eine signifikante Anreicherung in Chondrozyten-spezifischen Signalwegen.....</i>	145
5.3.4	<i>Die Anzahl reprimierender Markierungen steigt während der hypertrophen Differenzierung an</i>	146
5.3.5	<i>Genregulation durch bivalente Markierung</i>	147
5.3.6	<i>Einige Gene zeigen unterschiedliche Histonmodifikations-Profile während der Differenzierung trotz ähnlicher Expression</i>	148
5.3.7	<i>Histonmodifikations-Profile offenbaren Regulationsmuster zur Transkription Chondrozyten-spezifischer Gene</i>	149
5.3.8	<i>Die Höhe der Peaks könnte mit der Transkriptionsrate korrelieren</i>	150
5.4	AUSBLICK	152
6	ZUSAMMENFASSUNG	155
7	ABSTRACT	158

8	LITERATURVERZEICHNIS	161
9	ANHANG	171
	DANKSAGUNG.....	172
	PUBLIKATIONEN	173
	LEBENS LAUF	174
	ERKLÄRUNGEN.....	176

Abkürzungsverzeichnis

α	anti-
Acan	Aggrecan
ADAMTS	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motifs</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bac	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Bmp	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Bsp	<i>Bone sialoprotein</i>
CBP	<i>cAMP response element-Bindeprotein</i>
ChIP	Chromatin–Immunopräzipitation
ChIP-seq	Chromatin–Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung
Col2a1	Collagen Typ 2, Alpha 1
Col10a1	Collagen Typ 10, Alpha 1
Dapi	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
Fgf	<i>Fibroblast growth factor</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GO	Gen Ontologie
h	Stunde

Hat	Histon-Acetyltransferase
H1	Histon 1
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H4	Histon 4
H3K14	Lysin 14 des Histons 3
H3K18	Lysin 18 des Histons 3
H3K23	Lysin 23 des Histons 3
H3K37	Lysin 37 des Histons 3
H4K20	Lysin 20 des Histons 3
H3K4me1	monomethyliertes Lysin 4 des Histons 3
H3K4me2	dimethyliertes Lysin 4 des Histons 3
H3K4me3	trimethyliertes Lysin 4 des Histons 3
H3K9ac	acetyliertes Lysin 9 des Histons 3
H3K9me3	trimethyliertes Lysin 9 des Histons 3
H3K27ac	acetyliertes Lysin 27 des Histons 3
H3K27me3	trimethyliertes Lysin 27 des Histons 3
H3K36me3	trimethyliertes Lysin 36 des Histons 3
H3K79me3	trimethyliertes Lysin 79 des Histons 3
H4K20me3	trimethyliertes Lysin 20 des Histons 4
Hdac	Histon-Deacetylase
Hdm	Histon-Demethylase
Hmt	Histon-Methyltransferase
HP1	Heterochromatin-Protein1
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IP	Immunopräzipitation
kDa	Kilodalton
M	Molar
MACS	<i>Model-based Analysis of ChIP-Seq</i>
Mef2c	<i>Myocyte enhancer factor 2c</i>
Mmp13	Matrixmetalloprotease 13
min	Minute
NDR	<i>Nucleosome-depleted region</i>

NGS	<i>Next generation sequencing</i>
mRNA	messenger RNA
p300	Histon-Acetyltransferase p300
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFA	Paraformaldehyd
Ppr	Parathroid hormone-related protein receptor
Ptch	Patched
PTHrP	<i>Parathyroid Hormone-related Peptide</i>
PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNA-Pol II S2P	RNA-Polymerase II phosphoryliert an Serin 2
RNA-Pol II S5P	RNA-Polymerase II phosphoryliert an Serin 5
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
Runx2	<i>Runt domain transcription factor 2</i>
sec	Sekunde (n)
ssDNA	einzelsträngige DNA
Sox9	<i>sex-determining factor SRY 9</i>
TBS	Tris-gepufferte Natriumchloridlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TE	Tris-EDTA
TFIID	Transkriptionsfaktor II D
TrxG	<i>Trithorax Group</i>
TSA	TrichostatinA
TSS	Transkriptionsstart (<i>transcriptional start site</i>)
Vegf	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Wnt5a	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A</i>
YFP	<i>Yellow Fluoreszent Protein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation.....	15
Abb. 2 Expressionsmuster Chondrozyten-spezifischer Markergene in der embryonalen Knorpelanlage.....	18
Abb. 3 Chromatinstruktur mit möglichen Histonmodifikationen	20
Abb. 4 Modifikation der Chromatinstruktur.....	21
Abb. 5 Verteilung der Histonmodifikationen an aktiven und reprimierten Genen	26
Abb. 6 ChIP-seq Workflow.....	34
Abb. 7 Illumina Sequenzierung.....	35
Abb. 8 ChIP-seq Analysen.....	36
Abb. 9 <i>Col2a1-Cre; R26R-YFP</i> Mäuse exprimieren YFP in allen proliferierenden Chondrozyten.....	66
Abb. 10 Schnittmodell durch die verschiedenen Chondrozytenzonen	67
Abb. 11 Die YFP-Expression kann in proliferierenden Chondrozyten, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten von P1 <i>Col2a1-Cre; R26R-YFP</i> Mäusen detektiert werden	68
Abb. 12 Hypertrophen Chondrozyten im Stadium P1 wiesen nur ein geringes YFP-Signal in <i>Col2a1-Cre; R26R-YFP</i> Mäusen auf.....	69
Abb. 13 YFP-Expression in <i>Col10a1-Cre; R26R-YFP</i> Mäusen	71
Abb. 14 Nachweis der <i>Col10a1-Cre</i> Aktivität in hypertrophen Chondrozyten	72
Abb. 15 Anreicherung von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten durch FACS	73
Abb. 16 Prä-Alignmentkontrollen zeigen sehr gute Read-Qualitäten.....	76
Abb. 17 Die biologischen Replikate der Datensätze wiesen eine hohe Reproduzierbarkeit auf.....	79
Abb. 18 Pearson Korrelation der unterschiedlichen Histonmodifikationen.....	82
Abb. 19 Vergleich der durch Read-Anreicherung markierten Gene.....	86
Abb. 20 Hohe Übereinstimmung der markierten Gene beim Vergleich der ES-Zell Datensätze.....	90
Abb. 21 Das <i>Sox9</i> Gen weist in proliferierenden Chondrozyten das typische Histonmodifikations-Muster für transkriptionell-aktive Gene auf.....	93
Abb. 22 Die Histonmodifikationen des <i>Col2a1</i> -Gen reflektiert die spezifische Expression in proliferierenden Chondrozyten.....	96

Abb. 23 Hypertrophe Chondrozyten zeigen eine hohe Read-Dichte aller Histonmodifikationen am <i>Col10a1</i> -Gen.....	99
Abb. 24 Transkriptionelle Aktivität von <i>Sox5</i> und <i>Sox6</i> in proliferierenden Chondrozyten	100
Abb. 25 Runx2 weist nur in proliferierenden Chondrozyten auf eine aktive Transkription hin.....	102
Abb. 26 Untersuchung von <i>Ihh</i> und seines Zielgens <i>Gli3</i>	104
Abb. 27 Die ES-Zell-spezifischen Gene, <i>Oct4</i> und <i>Sox2</i> , zeigen eine hohe Anreicherung von aktivierenden Markierungen in ES-Zellen.....	106
Abb. 28 <i>Neurod1</i> zeigt keine Anreicherungen in Chondrozyten	108
Abb. 29 Gene der „ <i>endochondralen Ossification</i> “ wurden in proliferierenden Chondrozyten durch alle aktivierenden Histonmodifikationen markiert	111
Abb. 30 In hypertrophen Chondrozyten wurde eine signifikante Anzahl an Genen des Apoptose Signalwegs als aktiviert markiert	113
Abb. 31 Die höchste Anzahl an bivalenten Genen wurde in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen.....	115
Abb. 32 H3K27me3 Modifikation reflektiert das Abschalten der Gene in hypertrophen Chondrozyten.....	117
Abb. 33 Enhancerverteilung.....	121
Abb. 34 In hypertrophen Chondrozyten wurde die höchste Anzahl an potentiell-aktiven Genen durch Enhancer reguliert	123
Abb. 35 Die Enhancer-Markierung kann bereits vor und nach transkriptioneller-Aktivität vorhanden sein	125
Abb. 36 Vergleich der Sox9-bindenden Enhancer	129

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Rohdaten der Chip-Sequenzierung von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten.....	78
Tab. 2 Peak-Analyse durch den <i>Enriched region detection</i> (ERD)-Algorithmus	84
Tab. 3 Die aktivierenden Histonmarkierungen weisen gegenüber den reprimierenden eine höhere Anzahl an identischen Genen auf	87
Tab. 4 Der ES-ChIP zeigt gute Alignment-Ergebnisse im Vergleich zu dem Mikkelsen-ChIP	89
Tab. 5 Signalweg Analyse von proliferierenden Chondrozyten	110
Tab. 6 Signalweg Analyse aktivierter Gene von hypertrophen Chondrozyten	112
Tab. 7 Anzahl der mit H3K4me3 und H3K27me3 markierten Gene	114
Tab. 8 Enhancer-Detektion durch H3K27ac	122
Tab. 9 Alignment und Peak-Detektion der Sox9 und RNA-Pol II S5 Sequenzdaten mittels StrandNGS	127
Tab. 10 Sox9-spezifischer Enhancer	129

1 Einleitung

Die Knochen des axialen und appendikularen Skeletts entstehen während der enchondralen Ossifikation. Die Anlagen des Skeletts werden von Mesenchymzellen gebildet, die zu Chondrozyten reifen und eine Zwischenstufe aus Knorpel bilden, welche später durch Knochen ersetzt wird. Die Knorpelzwischenstufe entsteht in mehreren strikt regulierten und komplexen Schritten, die entscheidend für die Länge des späteren Knochens sind. Zum Wachstum der Knorpelanlagen beginnen die Chondrozyten zu proliferieren, daraufhin differenzieren sie und werden hypertroph. Schlussendlich werden die hypertrophen Chondrozyten durch Knochen ersetzt. An der Reifung, Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten sind unzählige regulatorische Moleküle, darunter zahlreiche Signalmoleküle und Transkriptionsfaktoren, beteiligt, deren Funktionen und Regulationsmechanismen bereits sehr gut beschrieben wurden (Akiyama und Lefebvre, 2011). In den letzten Jahren zeigte sich, dass epigenetische Faktoren an der Regulation der enchondralen Ossifikation grundlegend beteiligt sind. Dabei wurden Histon-modifizierende Enzyme identifiziert, welche die Zugänglichkeit des Chromatins regulieren. Mittlerweile wurden zahlreiche Histon-Acetyltransferasen und Histon-Methyltransferasen, sowie ihre Gegenspieler, die Histon-Deacetylasen und Histon-Demethylasen identifiziert, die über Histonmodifikationen die Transkription steuern (Bradley et al., 2011; Klose et al., 2006).

Bisherige Untersuchungen zeigten einen globalen Anstieg der Histon-Acetylierung im Verlauf der *in vitro* Differenzierung von Chondrozyten (Masterarbeit Thiesen A.M., 2012). Zudem konnte eine Regulation der Histon-modifizierenden Enzyme durch Chondrozyten-spezifische Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Kozhemyakina et al., 2009; Wuelling et al., 2013). Ob Veränderungen des Histon-Codes im Verlauf der *in vivo* Chondrozytendifferenzierung auftreten wurde bisher noch nicht untersucht.

In dieser Arbeit sollten die Histonmodifikationen von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten umfassend analysiert werden. Dazu sollten Histonmodifikations-Profile erstellt werden, um neue Erkenntnisse über die Veränderung des Histon-Codes während der Chondrozytendifferenzierung zu gewinnen.

1.1 Das Skelett: Knorpel und Knochen

Das Skelett der Vertebraten ist ein mechanisches und endokrines Organ, welches die Bewegung ermöglicht und die inneren Organe schützt. Es dient zudem der Mineralhomöostase und beherbergt hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen zur Blutbildung und Immunabwehr (Lee et al., 2007; Quarles, 2008; Yin und Li, 2006). Das menschliche Skelett besteht aus 206 Knochen, die je nach Lage und Funktion unterschiedliche Größen und Formen aufweisen. Die Ossifikation, also die Bildung von Knochengewebe, kann auf zwei verschiedene Arten vonstattengehen, durch die enchondrale und die desmale Ossifikation. Während der desmalen Ossifikation kondensieren Mesenchymzellen und differenzieren direkt in Osteoblasten, welche Teile der Schädel und des Schlüsselbeins bilden. Während der enchondralen Ossifikation, durch die beispielsweise die langen Röhrenknochen des axialen und appendikulären Skeletts gebildet werden, kondensieren Mesenchymzellen, differenzieren in Chondrozyten und werden später durch Knochen ersetzt. Die Chondrozyten bilden gemeinsam mit extrazellulären Matrixmolekülen (EZM-Molekülen) das Knorpelgewebe. Die Knorpelanlagen sind somit das erste Skelett der Vertebraten. Im adulten Organismus verbleibt der Knorpel an den Gelenken, der Nase, den Ohren und den Atemwegen. Abhängig von der Matrix-Zusammensetzung unterscheidet man drei Arten von Knorpel. Der vorwiegende Knorpel im ausgewachsenen Organismus ist der hyaline Knorpel der Gelenke. Im Unterschied dazu befindet sich der Faserknorpel beispielsweise in den Bandscheiben und der elastische Knorpel tritt in den Ohrmuscheln auf.

Knorpel besteht zum größten Teil aus Wasser, Proteoglykanen und Hyaluronsäure. In diese EZM sind die Chondrozyten eingelagert. Die Hauptaufgabe der Chondrozyten ist die Bildung dieser EZM, die je nach Lage und Funktion der Chondrozyten unterschiedliche Collagene und Proteoglykane produzieren. Neben den Chondrozyten existieren Chondroblasten und Chondroklasten, welche für den Auf- und Abbau des embryonalen Knorpelgewebes während der enchondralen Ossifikation und für die Heilung und Reparatur von Frakturen im erwachsenen Körper zuständig sind.

Der größte Teil des Skeletts besteht jedoch aus Knochen, von dem etwa 85 % die Kompakta ausmacht, die Verformungs-, Biege- und Rotationskräften entgegenwirkt. Das Innere des Knochens wird von der schwammartig aufgebauten Spongiosa ausgefüllt und macht 15 % des Knochens aus. In den meisten Knochen sind die Collagenfibrillen der Spongiosa gleichförmig angeordnet und bilden den sogenannten Lamellenknochen.

Zwischen den Trabekeln der Lamellenknochen befindet sich das Knochenmark. Die Architektur der Trabekel dient zur Herabsetzung der Druck- und Zugbelastung. Um den permanenten Umbau des Knochens zu gewährleisten, werden die Osteoblasten, welche für den Knochenaufbau zuständig sind und die Osteoklasten, welche Knochensubstanz abbauen können, benötigt. Den Hauptbestandteil der Knochenzellen machen die reifen Osteozyten aus. Diese sind von der Knochenmatrix umschlossen und dienen deren Erhaltung und der Calciumhomöostase. Neben EZM-Molekülen, wie z. B. Collagenfibrillen, besteht der fertig ausgebildete Knochen aus den festigenden Komponenten Calciumphosphat und Hydroxylapatit.

1.1.1 Enchondrale Ossifikation

Während der enchondralen Ossifikation entstehen Knochen- und Knorpelzellen aus einer gemeinsamen Osteochondroprogenitor-Zelle. Diese Vorläuferzellen zur Bildung der Extremitätenknochen und des Sternums stammen aus dem Seitenplattenmesoderm, während die Rippen und Wirbelsäule aus dem paraxialen Mesoderm gebildet werden.

Zu Beginn der enchondralen Ossifikation kondensieren die mesenchymalen Osteochondroprogenitor-Zellen und bilden eine knorpelige Anlage (Abb. 1A). Die inneren Zellen der Matrizze differenzieren in frühe, proliferierende Chondrozyten, während die äußeren Zellen das Perichondrium bilden (Abb. 1B). In mehreren Schritten differenzieren diese Chondrozyten in hypertrophe Chondrozyten und bilden die Wachstumsfuge, die für das Längenwachstum verantwortlich ist. Die proliferierenden Chondrozyten flachen zu Beginn der Differenzierung ab und ordnen sich longitudinal in Säulen an (kolumnare Chondrozyten) (Abb. 1C). Somit verbleiben runde Chondrozyten an den distalen Enden (distale Chondrozyten) und abgeflachte, kolumnare Chondrozyten entstehen zur Mitte der Knorpelanlage. Daraufhin beenden diese die Proliferation, treten aus dem Zellzyklus aus und werden prähypertroph. Anschließend nehmen sie stark an Volumen zu und reifen zu hypertrophen Chondrozyten (Abb. 1C). Signale der hypertrophen Zone induzieren dabei die Verknöcherung des Perichondriums zum Periost.

Mit den einwandernden Blutgefäßen werden Osteoblasten-Vorläuferzellen in die hypertrophe Zone eingebracht, welche zu Osteoblasten differenzieren und das primäre Ossifikationszentrum zum Aufbau des trabekulären Knochens bilden (Abb. 1D) (Clarkin und Olsen, 2010; Maes et al., 2010). Die hypertrophen Chondrozyten gehen in Apoptose

oder transdifferenzieren in Osteoblasten (Roach et al., 1995; Zhou et al., 2014). Das von den hypertrophen Chondrozyten sezernierte Matrixgeflecht dient als Gerüst, in welches sich die Osteoblasten-Vorläuferzellen und hämatopoetischen Stammzellen zur Hämatopoese einlagern. Die Bildung des primären Ossifikationszentrums beginnt bei Mäusen um den embryonalen Tag 14.5 (E14.5) und beim Menschen etwa in der fünften Schwangerschaftswoche.

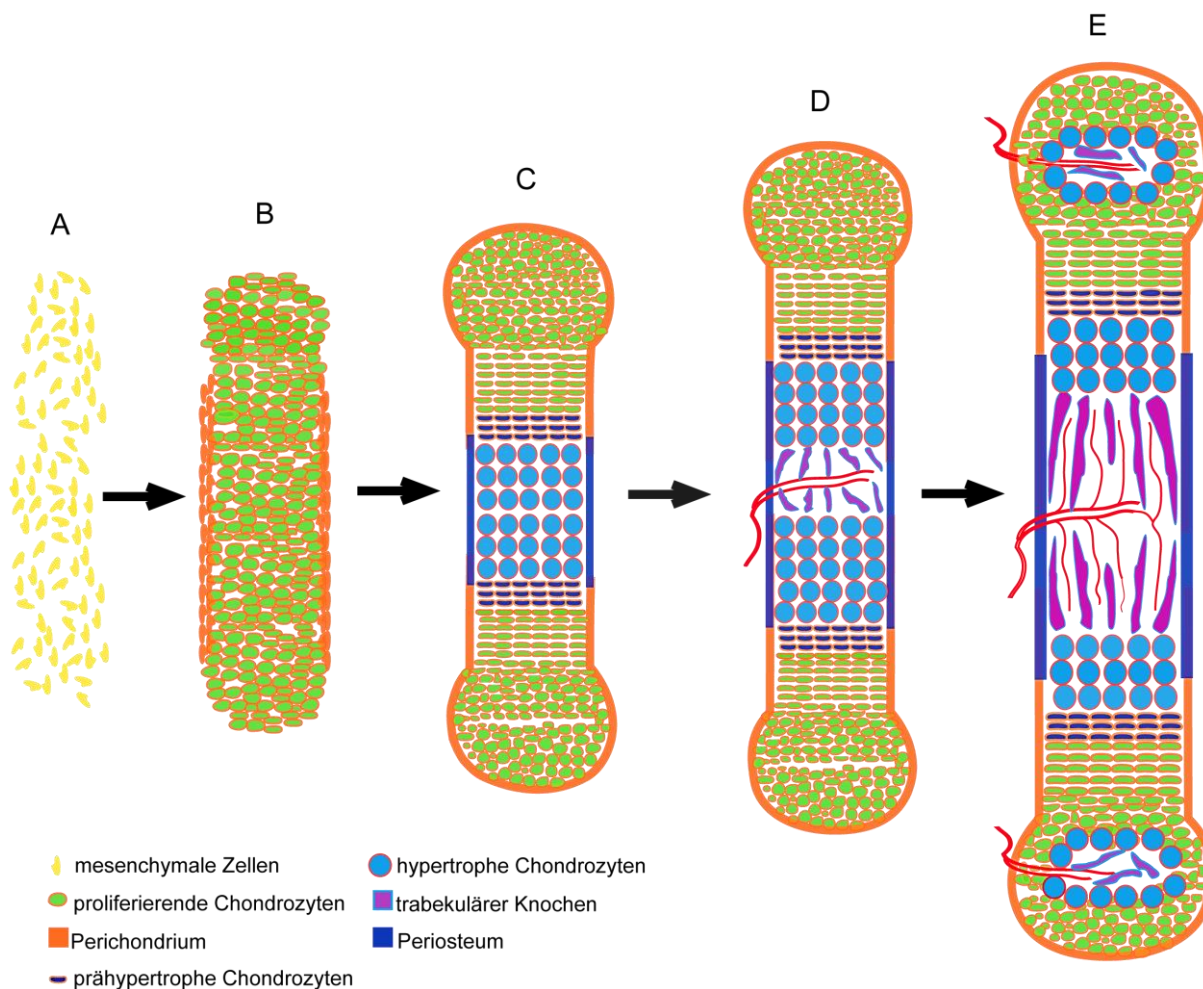


Abb. 1 Schematische Darstellung der enchondralen Ossifikation

(A) Mesenchymzellen (gelb) beginnen zu kondensieren und (B) differenzieren in proliferierende Chondrozyten (grün-orange) und die sie umgebenden, perichondralen Zellen (orange). (C) Proliferierende Chondrozyten differenzieren weiter in prähypertrophe Chondrozyten (dunkelblau-orange). Es kommt zu einer Größenzunahme und dem Austritt aus dem Zellzyklus. (D) Die reifen hypertrophen Chondrozyten (blau-orange) gehen teilweise in Apoptose oder transdifferenzieren in Osteoblasten. Das Perichondrium (orange) beginnt zu verknöchern und bildet das Periost (dunkelblau). Vom Periost wandern Blutgefäße ein, die Osteoblasten und Chondroklasten transportieren. Die Chondroklasten degradieren die Knorpelmatrix, während Osteoblasten die Knochensubstanz (violett) aufbauen. (E) Nach der Geburt bilden sich sekundäre Ossifikationszentren in den Epiphysen.

Während der Embryogenese kommt es zu einem rapiden Knochenwachstum durch die hohe Proliferationsrate der kolumnaren Chondrozyten und deren Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten. Erst nach der Geburt werden die sekundären Ossifikationszentren in den Epiphysen ausgebildet (Abb. 1E). Die Differenzierung der Chondrozyten erfolgt gleich den primären Ossifikationszentren. Zwischen den sekundären und den primären Ossifikationszentren proliferieren und differenzieren die Chondrozyten weiterhin und bilden die Wachstumsfuge, die für das postnatale Längenwachstum verantwortlich ist.

1.1.2 Molekulare Regulation der Chondrozytendifferenzierung

Entscheidend für das kontrollierte Wachstum der Knochen ist die Balance zwischen Chondrozytenproliferation und Hypertrophie. Während dieser Prozesse entstehen distinkte Zellpopulationen, die morphologisch und molekular unterschieden werden können. Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen wurde bereits identifiziert, die diese Schritte regulieren.

Während der mesenchymalen Kondensation exprimieren die Osteochondroprogenitor-Zellen den Masterregulator der frühen Chondrozytendifferenzierung Sox9 (sex-determining factor SRY) (Abb. 2) (Dy et al., 2012; Lefebvre und Bhattaram, 2010). Die frühen Knorpel Elemente bestehen zu Beginn aus runden Chondrozyten, die weiterhin Sox9 exprimieren, welches die Synthese der Chondrozyten-spezifischen Matrixmoleküle Collagen 2 (Col2a1) und Aggrecan (Acan) induziert (Liu und Lefebvre, 2015). Sox9 kooperiert dabei mit zwei weiteren Mitgliedern der Sox-Familie: Sox5 und Sox6 (Akiyama et al., 2005; Bi et al., 1999). Alle drei Sox-Mitglieder werden sowohl in den proliferierenden, als auch in prähypertrophen Chondrozyten, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 2) (Lefebvre et al., 1998).

Während die runden Chondrozyten proliferieren, ihre Form abflachen und sich in Säulen anordnen, beginnt die Expression von weiteren wichtigen Differenzierungs-spezifischen Faktoren, wie *Runx2* (*Runt domain transcription factor 2*), *Mef2c* (*Myocyte-specific enhancer factor 2C*), *Fgfr3* (*fibroblast growth factor receptor 3*) und *Ihh* (*Indian hedgehog*). Die Differenzierung von kolumnaren zu prähypertrophen Chondrozyten wird durch Runx2, den Masterregulator der späten Chondrozyten- und Osteoblastendifferenzierung, eingeleitet. Die Expression von Runx2 beginnt bereits während der mesenchymalen Kondensation des E11.5 Mausembryos und kann in proliferierenden Chondrozyten und

im Perichondrium des E13.5 Embryos detektiert werden. In späteren Stadien beschränkt sich die Expression auf die prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten (Abb. 2) (Gross et al., 2012; Stricker et al., 2002). Mef2c wird wie Runx2 bereits in der mesenchymalen Knorpelanlage des E12.5 Mausembryos exprimiert. Zudem wird es stark in prähypertrophen Chondrozyten des E14.5 Embryos und gering in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Arnold et al., 2007). Runx2 und Mef2c induzieren die Hypertrophie und regulieren die Expression von *Ihh* und *Col10a1* (Yoshida et al., 2004). Sox9 interagiert und inhibiert Runx2 wodurch die hypertrophe Differenzierung in proliferierenden Chondrozyten verhindert wird (Zhou et al., 2006).

Das Signalmolekül *Ihh* wird ausschließlich in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert (Abb. 2). Es aktiviert die Chondrozytenproliferation und inhibiert die hypertrophe Differenzierung durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der Gli-Familie: Gli1, Gli2 und Gli3 (St-Jacques et al., 1999). Durch *Ihh* wird der Bmp (*Bone morphogenetic protein*)-Signalweg und damit die Chondrozytenproliferation aktiviert. Der Bmp-Signalweg wirkt antagonistisch zum Fgf (*Fibroblast growth factor*)-Signalweg. Der Fgf-Signalweg führt zur Inhibition von *Ihh* und beschleunigt gleichzeitig die hypertrophe Differenzierung. Fgf-Signale werden in Chondrozyten unter anderem über den Fgf-Rezeptor 3 (Fgfr3) vermittelt. Die *Fgfr3*-Expression beginnt bereits in proliferierenden Chondrozyten und findet hauptsächlich in prähypertrophen Chondrozyten statt (Abb. 2), wo Fgfr3 die hypertrophe Differenzierung aktiviert (Minina et al., 2002).

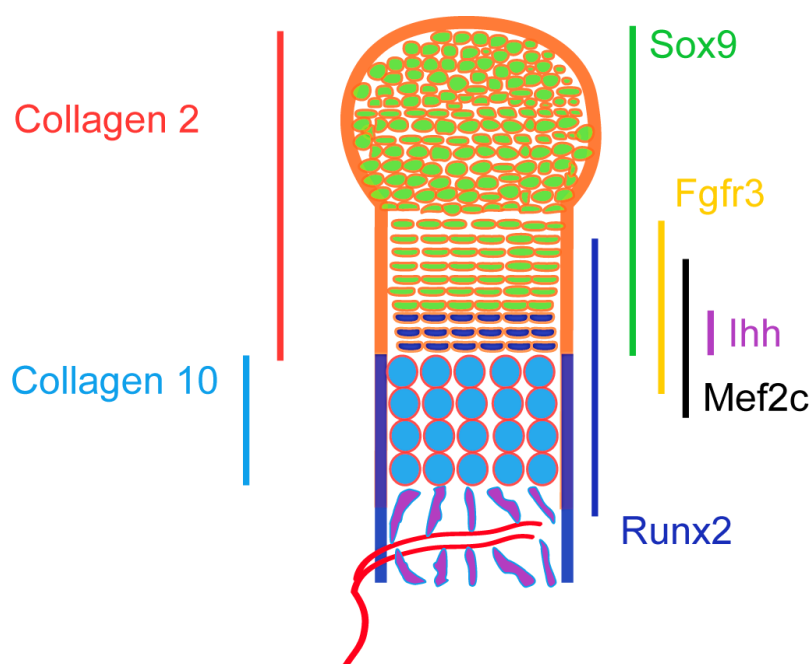


Abb. 2 Expressionsmuster Chondrozyten-spezifischer Markergene in der embryonalen Knorpelanlage

Während der enchondralen Ossifikation werden die EZM-Moleküle Collagen 2 (orange) in den proliferierenden bis prähypertrophen Chondrozyten exprimiert, während Collagen 10 (blau) ausschließlich in den hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird. Sox9 (grün) wird in allen proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert, während Mef2c (schwarz) und Fgfr3 (orange) hauptsächlich von prähypertrophen Chondrozyten exprimiert werden. Die Ihh-Expression (lila) findet ausschließlich in den prähypertrophen Chondrozyten statt. Diese prähypertrophen Chondrozyten bilden zudem Runx2 (dunkelblau), welcher ebenfalls in hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird.

Das *Col10a1*-Gen wird sowohl von Runx2 als auch von Mef2c aktiviert und kann nur in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden. Beim Umschalten von Proliferation zur Hypertrophie wird die Bildung von fibrillärem Collagen 2 durch das Netz-bildende Collagen 10 abgelöst. (Abb. 2).

1.1.3 Skelettale Dysplasie

Mutationen von Knorpel- oder Knochen-spezifischen Genen führen häufig schon während der enchondralen Ossifikation zur Störung der Proliferation und hypertrophen Differenzierung. Diese Fehlregulationen haben schwerwiegende Folgen für das Auswachsen des Knochens und werden als skelettale Dysplasien bezeichnet. Die Prävalenz einer skelettalen Fehlbildung liegt bei 1:5.000 Geburten. Von den Betroffenen werden etwa 25 % tot geboren und 30 % versterben bereits in der neonatalen Phase.

Momentan sind mehr als 350 skelettale Fehlbildungen bekannt, die unterschiedliche Anomalien in Form und Größe des Skeletts aufweisen. Allgemeine Symptome sind verkürzte, verbogene oder gebrochene Knochen, das Fehlen von Knochen, Duplikationen der Finger oder Zehen, asymmetrisches Knochenwachstum, ungleichmäßige Knochendichte und Mineralisierungsdefekte (Krakow und Rimoin, 2010; Savarirayan und Rimoin, 2002). Diese Fehlbildungen von Knorpel und Knochen können zu schweren Lungen-, Herz- und neurologischen Störungen führen, sowie orthopädische, psychologische und auditorische Probleme mit sich bringen. Viele der skelettalen Dysplasien sind zurzeit nur unzureichend behandelbar. Die Störung der normalen Skelettentwicklung hat somit schwerwiegende Konsequenzen für die Gesundheit und die Lebensqualität der Betroffenen.

1.1.4 Knochenfehlbildungen durch Mutationen Chondrozyten-spezifischer Gene

Ursachen vieler skelettalen Dysplasien sind Mutationen in den Genen verschiedener Proteine, wie Transkriptionsfaktoren, EZM-Molekülen, Liganden und Rezeptoren.

Eine heterozygote Mutation von *Sox9* im Menschen führt zur campomelen Dysplasie, die sich in einer starken Verformung der langen Röhrenknochen äußert (Wagner et al., 1994).

Ebenso schwerwiegend sind verschiedene humane Mutationen des *Runx2*-Gens. Diese führen zur autosomal-dominant vererbbaen Krankheit der kleidokranialen Dysplasie, welche durch fehlgebildete oder fehlende Schlüsselbeinknochen, sowie offene Fontanellen und Schädelnähte charakterisiert ist (Mundlos et al., 1997; Otto et al., 2002).

Eine *missense*-Mutation des *Fgfr3*-Gens führt zur autosomal-dominant vererbbaen Achondroplasie (Wilkin et al., 1998). Die Achondroplasie ist die häufigste Form des Kleinwuchses. Hingegen hat eine heterozygote *missense*-Mutation im *Ihh*-Gen geringere Auswirkungen, indem es zu einer abnormalen Fingerentwicklung führt (Gao et al., 2009).

Neuste *high-throughput* Sequenzierungs-Technologien konnten in den letzten Jahren zusätzliche Mutationen in epigenetische Regulatoren, wie Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon Deacetylasen (HDACs) aufdecken, welche bereits im Fötus die reguläre Bildung und das Wachstum der Knochen verhindern (Campeau et al., 2012; Williams et al., 2010). Einige Knochenerkrankungen konnten bereits mit einer veränderten HDAC-Expression in Verbindung gebracht werden. So wurde eine erhöhte Expression von HDAC5 bei jungen Osteoporose-Patienten und eine inaktivierende HDAC4-Mutation bei Brachydaktylie-Patienten entdeckt (Li et al., 2009; Williams et al., 2010).

Wie sich die Histonmodifikationen während der enchondralen Ossifikation verändern und wie die Differenzierung reguliert wird ist zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend unbekannt. Um jedoch effiziente Therapiemöglichkeiten entwickeln zu können, müssen die Grundlagen der komplexen Knorpel/Knochenentwicklung und -Regulation aufgeklärt werden.

1.2 Epigenetische Regulationsmechanismen

Die genomische, eukaryotische DNA bildet zusammen mit DNA-bindenden Proteinen, den Histonen, das Chromatin. Die Struktur des Chromatins ist sehr flexibel, so dass die DNA lokal dekontensiert und remodelliert werden kann, um sie für die Replikations-, Transkriptions- und Reparaturmaschinerie zu öffnen oder für die mitotische Teilung zu kompaktieren. Das Chromatin wird unterteilt in unzugängliches, stark kompaktiertes Heterochromatin und offenes, zugängliches und nur leicht verpacktes Euchromatin. Mit Hilfe der Histone kann die DNA auf das 10.000-fache kondensiert und ihre Zugänglichkeit reguliert werden.

Das Nukleosom ist die Untereinheit des Chromatins und besteht aus einem Oktamer aus Histonen (je zwei H2A, H2B, H3 und H4), deren amino-terminaler Schwanz posttranskriptional durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, SUMOylierung (*small ubiquitin-like modifier*) und ADP (Adenindiphosphat)-Ribosylierung modifiziert werden kann. Diese Modifikationen dienen zum einen der Änderung der Chromatin-Kondensation und zum anderen der Interaktion mit anderen Proteinen. Insgesamt sind 146 Basenpaare um ein Nukleosom gewickelt, welches einer 1,65-fachen Umrundung der DNA um das Nukleosom entspricht. Die DNA-Umrundung um das Nukleosom wird mit dem Linker-Histon H1 verschlossen um eine höher organisierte Kondensation zu ermöglichen.

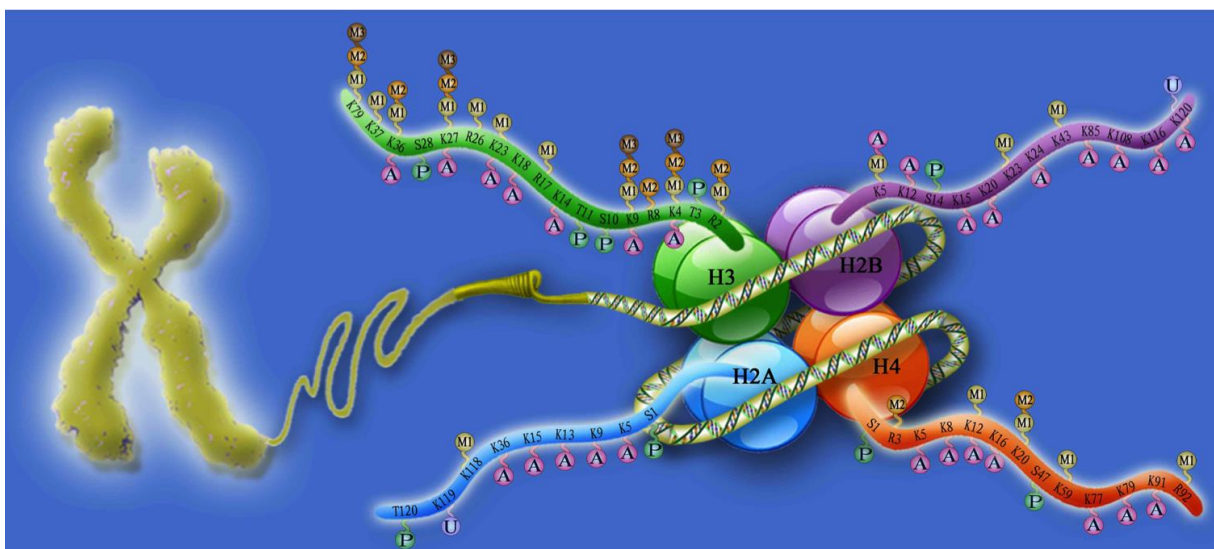


Abb. 3 Chromatinstruktur mit möglichen Histonmodifikationen

Durch den Aufbau des Chromatins lässt sich die DNA in den Metaphasechromosomen (gelb) stark kondensieren und ebenso flexibel für die Transkription und Replikation wieder öffnen. Die DNA (gelb mit blau-roter Helix) ist als Doppelhelix (gelb) um das Nukleosom, bestehend aus einem Oktamer von je zwei

H2A (hellblau), H2B (lila), H3 (grün) und H4 (orange) Proteinen, gewickelt. Die N-terminalen Histonschwänze können an verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich modifiziert werden (kleine Kreise), wobei sich die Acetylierung (A, pink) und die Methylierung (M) an derselben Aminosäure ausschließen. Die Methylierung kann als Mono- (M1, gelb), Di- (M2, orange) oder Tri- (M3, rot) Methylierung vorliegen. Zudem können die Histonschwänze phosphoryliert (P, grün) oder ubiquitinyliert (U, lila) werden. Abbildung modifiziert nach Group of Computational Epigenetic Research, College of Bioinformatics Science and Technology, Harbin Medical University, China.

1.2.1 Genregulation durch Histon-modifizierende Enzyme

Die wichtigsten Chromatinveränderungen zur Genregulation sind die Histonacetylierungen und -methylierungen, welche größtenteils an Histon 3 und 4 stattfinden (Abb. 3). Die Acetylierung und Deacetylierung erfolgt durch Hats und Hdacs an den Lysinresten (K) von H3K4, H3K9, H3K14, H3K18, H3K23, H3K27 und H3K36. Dabei sind alle Histonacetylierungen Gen-aktivierende Markierungen. Histonmethylierungen und -demethylierungen erfolgen über Histon-Methyltransferasen (Hmts) und Histon-Demethylasen (Hdmts) an H3K4, H3K9, H3K23, H3K27, H3K36, H3K37, H3K79 und H4K20. Dabei können die Lysinreste mono-, di- und tri-methyliert werden. Histonmethylierungen können Transkriptions-aktivierende und -reprimierende Markierungen sein. Aktivierend wirken die Methylierungen an H3K4me1-3, H3K36me2-3 und H3K79me3, wohingegen H3K9me3, H3K27me3 und H4K20me3 reprimierend sind (Wang et al., 2008).

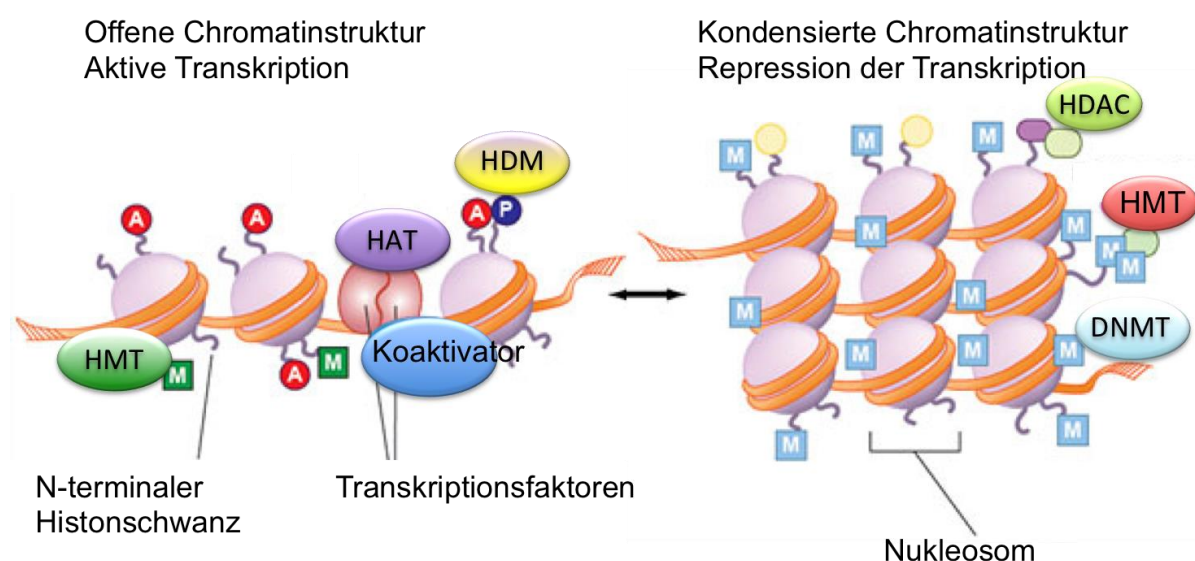


Abb. 4 Modifikation der Chromatinstruktur

Die Zugänglichkeit der DNA (orange) wird über Histon- und DNA-modifizierende Enzyme gesteuert. Histon-Acetyltransferasen (HATs) (lila) acetylieren (roter Kreis A) den N-terminalen Histonschwanz und öffnen damit die Chromatinstruktur. Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren binden und initiieren die Transkription. Histon-Methyltransferasen (HMTs) (dunkelgrün, rot) und Histon-Demethylasen (HDMs) (gelb) transferieren oder entfernen eine Methylgruppe (grünes Viereck M). Sie können sowohl aktivierende als auch reprimierende Funktionen aufweisen. Histon-Deacetylasen (HDACs) (hellgrün) und DNA-Methyltransferasen (DNMTs) (hellblau) führen zur Repression der Transkription. Abbildung modifiziert nach Annals of the New York Academy of Sciences, 2011.

1.2.1.1 Histon-Acetyltransferasen (Hats)

Hats transferieren eine Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf ein Epsilon-N-Lysin der Histone. Dadurch neutralisieren die Acetylgruppen die positive Ladung der Histone und reduzieren die Affinität zur negativ geladenen DNA. Dies öffnet die Chromatinstruktur, so dass Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase binden können, um die Transkription einzuleiten. Hats werden ubiquitär exprimiert. Basierend auf ihrer subzellulären Lokalisation werden sie in zwei Gruppen, Typ A und Typ B, eingeteilt. Typ A Hats befinden sich im Nukleus und acetylieren DNA-assoziierte Histone. Sie besitzen eine Bromodomäne, welche acetylierte Lysinreste erkennt und bindet. Zur Typ A Gruppe gehören Gcn5/PCAF, p300/CBP und TAFII250 als Untereinheit der RNA-Polymerase. Die Acetyltransferasen Gcn5 und PCAF (p300/CBP-assoziiierter Faktor) weisen eine hohe Sequenzhomologie auf und acetylieren beide als Substrat H3 an Lysin 9 (Jin et al., 2011). Zwei weitere paraloge Hats sind CBP (CREB: *cAMP response element-binding protein*) und p300, die beide essentielle Koaktivatoren der Transkription sind und die Lysinreste von H3K18 und K3K27 acetylieren (Jin et al., 2011).

Im Gegensatz zu den Typ A Hats besitzen die Typ B Hats keine Bromodomäne. Sie befinden sich im Zytoplasma und acetylieren neu synthetisierte Histone bevor diese in den Nukleus transportiert werden. Die Typ B Hats tragen somit nicht direkt zur Genregulation bei (Roth et al., 2001).

1.2.1.2 Histon-Deacetylasen (Hdacs)

Hdacs arbeiten antagonistisch zu den Hats und entfernen Acetylgruppen von Histonen, welches zur Kondensation der DNA führt und so die Transkription reprimiert (de Ruijter et al., 2003). Hdacs werden aufgrund ihrer Struktur und Funktion in vier Klassen unterteilt. Die Klasse I Hdacs (Hdac1, 2, 3 und 8) werden ubiquitär exprimiert, sind im Nukleus lokalisiert und besitzen eine C-terminale katalytische Domäne (Yang et al., 2002).

Klasse II Hdacs (Hdac4, 5, 6, 7, 9 und 10) werden gewebespezifisch exprimiert und relokalisieren vom Zytosol in den Nukleus. Die Klasse II wird aufgrund ihrer katalytischen Domänen nochmal unterteilt in die Klassen IIa und IIb. Klasse IIa (Hdac4, 5, 7 und 9) besitzt eine N-terminale katalytische Domäne, während die Klasse IIb (Hdac6 und 10) zwei katalytische Domänen besitzt. Hdac11 besitzt sowohl Eigenschaften von Klasse I als auch von Klasse II und wird deshalb in eine eigene Klasse (Hdac Klasse IV) eingeordnet. Die Klasse III Hdacs sind Sirtuine (Sirts 1-7), die unterschiedliche Lokalisationen aufweisen. Sirt 1, 6 und 7 befinden sich nukleär, während Sirt 2 zytosolisch und Sirt 3, 4, 5 mitochondrial zu finden sind (Michishita et al., 2005). Während Sirtuine NAD (Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängig sind, katalysieren die enzymatischen Domänen der Klassen I, II und IV Hdacs Zink-abhängig ihre Ziel-Histone.

1.2.1.3 Histon-Methyltransferasen (Hmts)

Es gibt 2 Typen von Hmts, Lysin- und Arginin-Hmts. Sie transferieren eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) an Lysin- oder Argininreste von Histonen. Das SAM entsteht im gleichnamigen SAM-Zyklus aus Methionin und Adenosintriphosphat. Lysinreste können mono-, di- und trimethyliert werden während Argininreste nur mono- und dimethyliert werden können. Lysin-spezifische Histon-Methyltransferasen besitzen eine evolutionär konservierte SET-Domäne zur Methylierung von H3 und H4.

Die meisten Erkenntnisse über Hmts wurden durch Untersuchungen in ES-Zellen gewonnen. In ES Zellen stabilisiert die Hmt ESET (*ERG-associated protein with SET domain*) den Stammzellcharakter und reguliert gemeinsam mit dem *Polycomb Repressive Complex* (PRC) Entwicklungs- und Differenzierungs-spezifische Gene (Bilodeau et al., 2009). Der PRC führt zur reprimierenden Trimethylierung von H3K27, welches wiederum mit H3K9me3 kooperiert und zur Aufrechterhaltung des Heterochromatins führt (Boros et al., 2014). Der Gegenspieler der PRC ist die *Trithorax Group* (TrxG), welche aktivierende Trimethylierungen von H3K4 und H3K36 katalysiert (Miyazaki et al., 2013; Schmitges et al., 2011). Über die reprimierende H3K27me3- und die aktivierende H3K4me3-Markierung steuern PRC und TrxG bivalente Gene (siehe Abschnitt 2.5). Zudem regulieren sie gemeinsam das epigenetische Gedächtnis der Zellen über die DNA-Replikation und Mitose hinaus (Steffen und Ringrose, 2014). Es existieren verschiedene TrxG-Proteine, die in unterschiedlichen TrxG-Komplexen agieren können, um Gene zu aktivieren und sie im aktiven Zustand zu halten (Schuettengruber et al., 2011). Die

Methyltransferase Setd2 des TrxG-Komplexes katalysiert die Trimethylierung von H3K36 während der transkriptionellen Elongation (Edmunds et al., 2008).

Neben Proteinkomponenten, die für die H3K4- und H3K36-Methylierung verantwortlich sind, besitzt die Utx (*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome*)-Untereinheit des TrxG-Komplexes eine Demethylase-Aktivität für H3K27me3 und CBP eine Histonacetyltransferase-Aktivität spezifisch für H3K27, um reprimierte Gene zu aktivieren (Geisler und Paro, 2015).

1.2.1.4 Histon-Demethylasen (Hdms)

Hdms werden abhängig von ihrer Struktur und enzymatischen Funktionalität in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe besteht aus zwei Lysin-spezifischen Demethylasen: KDM1A und KDM1B. Sie besitzen eine Flavin Adenin Dinukleotid (FAD)-abhängige Amin-Oxidase, die ein freies Elektronenpaar zur Demethylierung benötigt und deshalb nur Mono- und Dimethyllysine demethylieren kann.

Die zweite Familie der Hdms besitzt eine Jumonji C (JmjC)-Domäne mit Oxygenase-Aktivität zur Demethylierung von Mono-, Di- und Trimethyllysinresten. Die Fe(II) und α -Ketoglutarat-abhängige Oxygenase verwendet nur ein Sauerstoffmolekül als Kofaktor zur Demethylierung (Tu et al., 2007). Im menschlichen Körper existieren 32 Gene mit JmjC-Domäne, davon besitzen 24 eine Demethylase-Aktivität. Diese werden wiederum in sieben funktional divergente Proteinfamilien eingeteilt (Klose et al., 2006).

1.2.2 Regulative Funktion von Histonmodifikationen

Ob und in wie stark ein Protein exprimiert wird von der Zugänglichkeit des Chromatins, der Bindung der RNA-Polymerase II und Elongation der Transkripte sowie von der Translation und Degradation der mRNA beeinflusst. Mittlerweile ist bekannt, dass einzelne Histonmodifikationen nicht ausreichen, um das Chromatin zu öffnen und die Transkription einzuleiten. Stattdessen ist eine dynamische Änderung des Histon-Codes und die Interaktion mit einer Vielzahl von Koaktivatoren an Promotor-, Enhancer und Gensequenzen ausschlaggebend, um die Expression zu induzieren (Abb. 5).

1.2.2.1 Aktivierung der Transkription

In humanen Zellen konnte bei einer Analyse von 39 verschiedenen Histonmodifikationen insgesamt 17 Modifikationen ausgemacht werden, die mit einer erhöhten Genexpression einhergehen (Wang et al., 2008). Die Rekrutierung der RNA-Polymerase II an den Promotor erfolgt durch H3K9ac und H3K4me3 (Guenther et al., 2007) (Abb. 5), wobei die H3K4 Trimethylierung zuerst auftritt und für die H3K9 Acetylierung benötigt wird (Wang et al., 2008). Durch die Rekrutierung wird die RNA-Polymerase II am C-terminalen Ende an Serin 5 (S5) phosphoryliert (RNA-Pol II S5P). Das Gen ist nun zur Transkription *geprint*, d. h. die RNA-Polymerase II wurde an den Promotor rekrutiert, aber die Transkription hat noch nicht begonnen. Erst die Phosphorylierung an Serin 2 (RNA-Pol II S2) und die Dephosphorylierung an S5 führt zur Start der Transkription durch die RNA-Polymerase II (Ahn et al., 2004). Zur Start der Transkription muss ein spezifischer Histon-Code am Promotor vorliegen, bestehend aus H3K9ac, H3K4me2, H3K4me3 und H3K27ac. Dieser Histon-Code zur Aktivierung der Elongation konnte mittels RNA-Expressionsdaten bestätigt werden (Chen et al., 2011). Die Histonmodifikationen zur Elongation der Transkripte durch die RNA-Polymerase II befinden sich über die kodierende Gensequenz verteilt (Abb. 5) (Pokholok et al., 2005). Dabei dienen als Marker der transkriptionell-aktiven RNA-Polymerase II die H3K36me3, H3K79me3 oder H4K20me1 Modifikationen an der kodierenden Gensequenz in Kombination mit den Transkriptions-initiierenden und -aktivierenden Markern H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac (Bannister et al., 2005; Karlic et al., 2010).

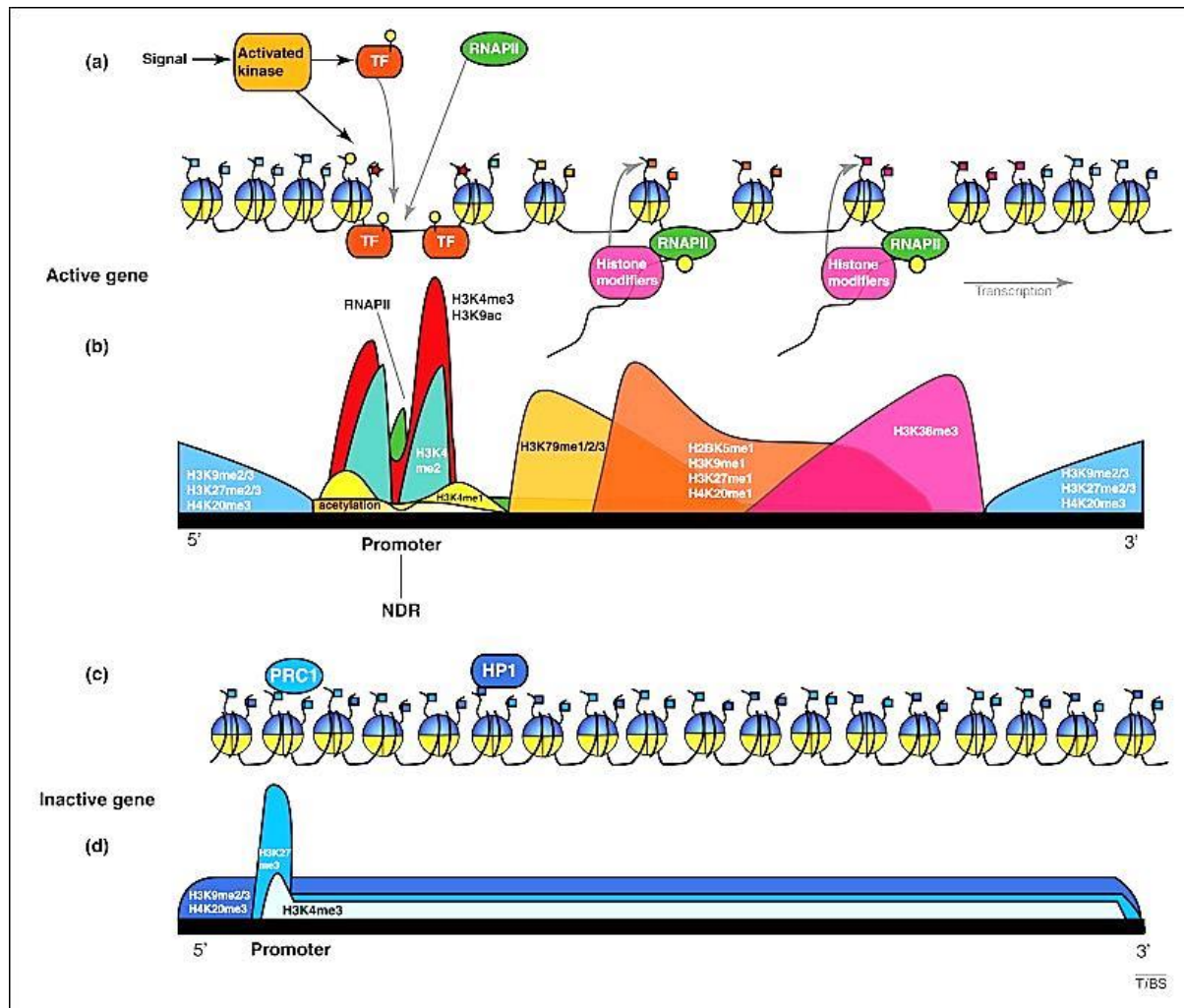


Abb. 5 Verteilung der Histonmodifikationen an aktiven und reprimierten Genen

An aktiven (a, b) und reprimierten (b, c) Genen treten unterschiedliche Histonmodifikations-Muster auf. Bei aktiven Genen zeigt die Nukleosomen-Übersicht (a) offenes Chromatin zur Einleitung der Transkription. Zur Initiation der Transkription können über verschiedene Signalwege Kinasen aktiviert werden, die die Transkriptionsfaktoren (TF), Histone und die RNA-Polymerase II phosphorylieren (gelbe Kreise). Zudem binden Histon-modifizierende Enzyme und die RNA-Polymerase II (RNAPII) zur Elongation der Transkripte an dem Promotor. An aktiven Genen zeigt die Histonmodifikations-Verteilung (b) die Akkumulation von H3K9ac und H3K4me3 als stärkste Peaks (rot) an der Promotorregion. Eine Anreicherung von H3K4me1 (gelb), H3K4me2 (hellgrün), acetylierten Histonen (orange) und der RNA-Polymerase II (dunkelgrün) ist ebenfalls um die TSS (transcriptional start site) zu finden. Typisch für offenes Chromatin und aktive Gene ist die Nukleosomen-freie Region (NDR=Nucleosome-depleted region) an der TSS. Die aktivierenden Modifikationen H3K36me3 und H3K79me1-3, die mit der Elongation der Transkripte durch die RNA-Polymerase II assoziiert sind, befinden sich über die Genstruktur verteilt. Die reprimierenden Modifikationen H3K9me2-3, H3K27me2-3 und H4K20me3 sind außerhalb der aktiven Genstruktur lokalisiert (blau). An inaktiven Genen (c) ist das Chromatin dicht verpackt zu Heterochromatin. Die Histone sind stark methyliert z. B. durch den *Polycomb Repressive Complex1* (PRC1), daraufhin bindet daran das Heterochromatin-Protein1 (HP1) zur Aufrechterhaltung des Heterochromatins. Die Histonmodifikations-

Verteilung (d) weist einen H3K27me3 Peak am Promotor auf und die reprimierenden Marker H3K9me2-3 und H4K20me3 sind über das Chromatin verteilt. Abbildung modifiziert nach (Barth und Imhof, 2010).

1.2.2.2 Enhancer-Regulation

Neben den Promotoren sind Enhancer von großer Bedeutung zur Regulation der Gen-Aktivierung. Die Enhancer gehören zu den wichtigsten *cis*-regulierenden Elementen. Sie können mehr als 1000 bp vom Gen entfernt liegen, um die Transkription zu regulieren (Visel et al., 2009).

Enhancer lassen sich durch H3K27ac-Anreicherungen außerhalb der TSS charakterisieren. Neben H3K27ac wird oftmals auch H3K4me1 zur Enhancer Detektion verwendet, wobei H3K4me1 sowohl an aktiven als auch an *poised* Enhancern zu finden ist (Creyghton et al., 2010). Von diesen traditionellen Enhancern von 1-2 kb Länge kann man sogenannte „Superenhancer“ unterscheiden. Sie werden charakterisiert durch multiple H3K27ac Peaks, die Detektion von gewebespezifischen Masterregulatoren und die Aktivität des dazugehörigen Gens, gemessen an der H3K9ac oder H3K4me3 Anreicherung (Adam et al., 2015; Whyte et al., 2013).

1.2.2.3 Bivalente Genregulation

Die spezifischen Histon-Marker für bivalente Gene sind eine Kombination aus der transkriptions-aktivierenden H3K4me3 und der reprimierenden H3K27me3 Modifikation. Bivalente Gene werden durch die H3K4me3 zur Transkription vorbereitet aber durch H3K27me3 an der Transkription gehindert. So können bivalente Gene, bei denen es sich meistens um Differenzierungs-spezifische Transkriptionsfaktoren handelt, schnell aktiviert und feinreguliert werden (Alder et al., 2010; Bernstein et al., 2006).

1.2.3 Systematische Analyse der Histonmodifikationen

Im Folgenden werden die Funktionen der in dieser Arbeit verwendeten Histonmodifikationen beschrieben.

1.2.3.1 H3K4me3

Die Transkriptions-aktivierende Histonmarkierung H3K4me3 ist an der TSS (*transcriptional start site*) lokalisiert. Dabei kolokalisieren H3K4me1 und H3K4me3 an

stark transkribierten Genen an 5-20 Nukleosomen um die TSS (Bernstein et al., 2005; Schneider et al., 2004). H3K4me3 rekrutiert die RNA-Polymerase II (Pol II S5P) und führt damit zur Initialisierung der Transkription (Jin et al., 2011). Während der frühen Embryonalentwicklung regulieren H3K4me3 und H3K27me3 gemeinsam bivalente Gene, die für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen eine entscheidende Rolle spielen.

1.2.3.2 H3K9ac

H3K9ac zentriert sich ebenso wie H3K4me3 an der TSS und ist an aktiv-transkribierten Genen lokalisiert (Karmodiya et al., 2012). H3K9ac wird zur Anlagerung und Elongation der Transkripte durch die RNA-Polymerase II (Pol II S2P) benötigt (Wang et al., 2008).

1.2.3.3 H3K9me3

Die reprimierende Markierung H3K9me3 ist verantwortlich für die Bildung von Heterochromatin und die Repression entwicklungssteuernder Gene (Bilodeau et al., 2009; Peters et al., 2001). H3K9me3 bildet im Gegensatz zu H3K9ac keine deutlichen Anreicherungen, sondern ist breit über das reprimierte Chromatin verteilt (Abb. 5). In ES-Zellen weisen H3K9me3 und H4K20me3 ähnliche Anreicherungsprofile auf und werden an Telomeren, Satelliten-DNA (ein Hauptbestandteil des Heterochromatins, sowie der Zentromere und Telomere) und an *long-terminal-repeats* (LTRs) detektiert (Mikkelsen et al., 2007).

1.2.3.4 H3K27ac

Die aktivierende Markierung von H3K27ac ist an der TSS von aktiv transkribierten Genen zentriert und markiert aktive Enhancersequenzen (Wamstad et al., 2012). Daher wird die Acetylierung von H3K27 zur Detektion und Identifikation von Enhancer-Elementen herangezogen (Cotney et al., 2012; Ohba et al., 2015; Wamstad et al., 2012).

1.2.3.5 H3K27me3

Die reprimierende Trimethylierung von H3K27 reguliert den Differenzierungsstatus von Zellen und wird auch während der Replikation aufrechterhalten (Boyer et al., 2006; Hansen et al., 2008; Lee et al., 2007). H3K27me3 tritt hauptsächlich sehr breit verteilt über das ganze Genom auf, in Domänen von hunderten von Kilobasen (Pauler et al., 2009; Squazzo et al., 2006). Durch genomweite Analysen konnten die beiden reprimierenden

Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 an Telomeren, an stillgelegten Promotoren und an inaktivierten X Chromosomen detektiert werden (Arnoult et al., 2012; Bilodeau et al., 2009; Escamilla-Del-Arenal et al., 2013).

Für H3K27me3 wurden drei unterschiedliche Anreicherungsprofile entdeckt, die mit der Genexpression korrelieren (Young et al., 2011). Das erste Anreicherungsprofil ist eine breite Domäne, die die gesamte Genstruktur überspannt und mit der Inhibition der Transkription verbunden ist. Die zweite Read-Anreicherung tritt bei bivalenten Genen in Verbindung mit der aktivierenden H3K4me3 Markierung um die TSS auf (Alder et al., 2010; Bernstein et al., 2006). Die dritte Read-Anreicherung wurde ebenfalls an der TSS entdeckt mit einer Verlagerung des Peaks zur Promotorregion. Diese korreliert mit der Anreicherung von RNA-Polymerase II und somit mit einer Aktivierung der Transkription.

1.2.3.6 H3K36me3

H3K36me3 ist über die kodierende Sequenz von transkribierten Genen lokalisiert, weist einen breiten Peak am 3'Ende auf und wird für die Elongation der Transkripte durch die RNA-Polymerase II (Pol II S2P) benötigt (Abb. 5) (Jin et al., 2011). In Hefen konnte gezeigt werden, dass die Hmt Set2 an die Pol II S2P bindet und während der Transkription die H3K36 Trimethylierung katalysiert (Fuchs et al., 2012). Die durch H3K36me3 markierten Exons von aktiv-transkribierten Genen zeigen zudem eine Interaktion mit dem Spleißosom, welches die prä-mRNA in mRNA prozessiert (Kolasinska-Zwierz et al., 2009). Somit dient die H3K36me3 als Marker der aktiven Genexpression.

1.2.4 Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch Histon-modifizierende Enzyme

Durch Inaktivierung oder Entfernung Histon-modifizierender Enzyme in Zelllinien und transgenen Mäusen, sowie durch die Analyse verschiedener Signalwege konnten die Funktionen einiger Histon-modifizierender Enzyme während der Chondrozytendifferenzierung genauer beschrieben werden.

Bisherige *in vitro* Daten zeigten einen globalen Anstieg der H3K9 Acetylierung im Verlauf der Differenzierung von proliferierenden zu hypertrophen Chondrozyten (Masterarbeit Thiesen, A.M., 2012). Zudem zeigte die Inhibition von Hdacs durch TSA eine beschleunigte Differenzierung der Chondrozyten (Dissertation Pasdziernik, 2012). Im Gelenkknorpel

reduzierten die Hdac-Inhibitoren TSA und Natriumbutyrat die Expression von Knorpelmatrix-abbauenden Enzymen wie die Matrixmetalloproteinase MMP13, welche Collagene degradiert, und ADAMTS (*a disintegrin and metalloproteinase domain with thrombospondin motifs*) Mitgliedern, die Aggrecan abbauen (Young et al., 2005).

In vivo ist die Deletion von Hats in Mäusen embryonal letal (Bedford et al., 2010; Roth et al., 2001). Während der enchondralen Ossifikation wurde bisher nur die Funktion von p300 untersucht, da es mit Sox9 interagiert und als Marker für Enhancersequenzen herangezogen wird.

Den Hdacs der Klasse I und II konnten in Chondrozyten bereits entscheidende regulatorische Funktionen zugewiesen werden. Hdac1 und 2 regulieren die Expression von Chondrozyten-spezifischen EZM-Molekülen wie Collagen 2, 9, 11 und Aggrecan (Hong et al., 2009; Huh et al., 2007). Hdac1-defiziente Mäuse sterben vor der mesenchymalen Kondensation zum Zeitpunkt E10.5, während die defizienten Mäuse des Sequenzhomologen Hdac2 meistens erst nach der Geburt sterben und starke Knochenwachstumsdefekte aufweisen (Lagger et al., 2002; Trivedi et al., 2007). Der Verlust von Hdac3 führt ebenfalls zum Tode während der frühen Embryonalentwicklung vor E10.5. Eine konditionale Deletion von Hdac3 in Osterix-exprimierenden Zellen (prähypertrophe, hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten) führt zu einer verminderten Körpergröße durch reduziertes Knochenvolumen (Razidlo et al., 2010). Hdac4 reguliert die hypertrophe Differenzierung, da eine Hdac4-Deletion zu einer beschleunigten Hypertrophie der Chondrozyten führt, welche mit einer vermindert Körpergröße einhergeht. Eine Überexpression von Hdac4 zeigt den gleichen Phänotyp wie eine Runx2 *loss-of-function* Mutation mit verzögerter Hypertrophie (Vega et al., 2004). Der Grund dafür ist die Interaktion von Hdac4 mit Runx2. Dabei inhibiert Hdac4 die Runx2-Aktivität und dadurch die hypertrophe Differenzierung. Über den PTHrP (*Parathyroid hormone-related protein*)-Signalweg wird Hdac4 im Zytosol von der PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) dephosphoryliert, dadurch wird es vom Gerüstprotein 14-3-3 befreit und transloziert in den Nukleus. Dort inhibiert Hdac4 den Transkriptionsfaktor Mef2c (*Myocyte-specific enhancer factor 2c*) und verhindert die Expression von Collagen 10 und die hypertrophe Differenzierung (Kozhemyakina et al., 2009). Daher kann die reduzierte hypertrophe Differenzierung und Ossifikation der Mef2c-defizienten Mäuse durch eine Hdac4 Mutation gerettet werden (Arnold et al., 2007).

Die Hmts Suv39h1 (*suppressor of variegation 3-9 homolog1*) und ESET (SETDB1, *SET domain bifurcated1*) werden beide in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert, wo sie die Methylierung von H3K9 katalysieren. Parallel dazu wurde ein erhöhtes H3K9me3-Level in prä- und hypertrophen Chondrozyten beschrieben (Ideno et al., 2013). Die mesenchymale Deletion von ESET führt zur beschleunigten Hypertrophie durch Inhibition von *Ihh*. ESET interagiert mit HDAC4 und inhibiert, durch die Hmt- und Hdac-Aktivität, die Runx2 Aktivität (Yang et al., 2013). Zudem rekrutiert ESET die DNA-Methyltransferase DNMT3A, sowie HDAC1 und HDAC2, wodurch die Transkription inhibiert wird (Li et al., 2006; Yang et al., 2013).

Hdms fungieren in Chondrozyten als Koaktivator der Transkription. Phf2 (*PHD finger protein2*) ist eine JmjC-Domäne tragende Hdm, die an Promotoren von Sox9 Zielgene bindet und für die Demethylierung von H3K9 sorgt. Die Deletion von Phf2 inhibiert die Sox9-abhängige Differenzierung der Chondrozyten (Hata et al., 2013). Eine weitere Hdm ist JmJD3 (*Jumonji domain-containing UTX*), die antagonistisch zu der Polycomb-vermittelten, transkriptionellen Repression wirkt und Bestandteil des *Trithorax*-Komplexes sein kann. JMJD3 wird von prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert und der Verlust führt zu einer starken Verkürzung der Extremitäten. JMJD3 interagiert mit Runx2 und demethyliert H3K27me3 am *Ihh*-Promotor. Dies führt zur Expression von *Ihh*, welches zur Proliferation der Chondrozyten benötigt wird. Gleichzeitig führt die Interaktion mit Runx2 zur Demethylierung von H3K27me3 am *Runx2*-Promotor und zu einer beschleunigten hypertrophen Differenzierung (Zhang et al., 2015).

Insgesamt haben Histon-modifizierende Enzyme grundlegende Funktionen bei der Regulation von Entwicklungs- und Chondrozyten-spezifischen Genen. Über die biologische Funktion der Histonmodifikationen in der Chondrozytendifferenzierung ist aber bisher noch nichts bekannt, deshalb sollten in dieser Arbeit verschiedene Kombinationen aus Histonmodifikationen zur Identifikation der Genregulation untersucht werden. Dabei werden transkriptionell-aktive Gene, Enhancer und bivalenter Gene analysiert.

Zur Bestätigung von aktiv-transkribierten Genen wird eine Kombination der vier aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 genutzt. Dabei müssen alle vier Histonmodifikationen gemeinsame Peaks an einem Gen

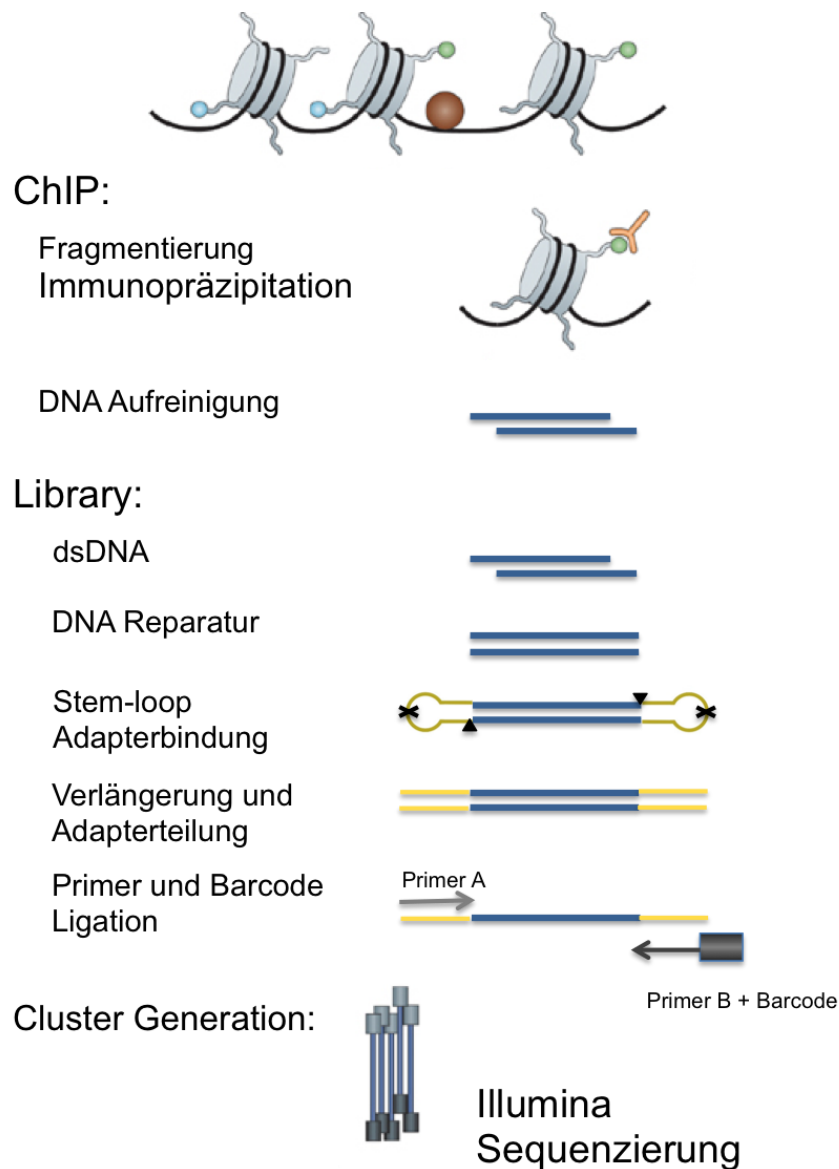
aufweisen. Zur Enhancer-Detektion wird die Acetylierung von H3K27 unabhängig von der TSS verwendet. Des Weiteren werden die Marker H3K4me3 und H3K27me3 zur Analyse der bivalenten Gene genutzt. Um reprimierte Gene zu identifizieren werden die Marker H3K9me3 und H3K27me3 verwendet.

1.3 ChIP-Seq zur Identifizierung epigenetischer Markierungen

Die Chromatin Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung (ChIP-seq) ist eine Technik zur genomweiten Profilerstellung von Histonmodifikationen, DNA-bindenden Proteinen und Nukleosomen.

Mit der ChIP-seq Methode können Bindungsstellen eines Zielproteins an der DNA und DNA-Bereiche mit veränderten Histonmodifikationen nachgewiesen werden. Dabei werden diese DNA-Fragmente durch Antikörper-Präzipitation angereichert, sequenziert, dem Genom zugeordnet und somit die Bindestellen der modifizierten Histone lokalisiert (Abb.6).

Nach Fixierung der Histone an die DNA wird diese fragmentiert, so dass Chromatinfragmente von 200-600 bp entstehen, die immunopräzipitiert werden. Für die Immunpräzipitation (IP) sind hoch-spezifische Antikörper gegen die einzelnen Histonmodifikations-Epitope notwendig. Als Negativkontrolle dient der IgG Antikörper, um unspezifische Bindungen auszuschließen. Als Positivkontrolle wird geschertes Chromatin vor der IP als Input entnommen. Mittels Magnet-gekoppelter IP kann in eine reine, doppelsträngige DNA (dsDNA) eluiert werden. Aus den isolierten DNA-Fragmenten wird in mehreren Schritten eine Library präpariert (Abb. 6). Zuerst werden die Fragment-Enden repariert zur *Stem-loop* Adapter Ligation. Daraufhin folgt die Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Dazu werden Primer, die homolog zu den *Stem-loop* Adaptern sind und spezifische Barcodes und Adapter für die *Flowcell* tragen, zugefügt. Somit erhalten alle DNA-Fragmente einer IP einen spezifischen Barcode zur Zuordnung der Sequenzierungs-Signale. Zudem dient die Amplifikation der Library der späteren robusten Read-Detektion am Genom (Metzker, 2010). Ziel ist es, die Komplexität der Library zu maximieren und die PCR und Amplifikations-basierten identischen Sequenzen zu minimieren. Die gepoolten Libraries werden daraufhin auf die *Flowcell* aufgetragen, dabei hybridisieren die DNA-Fragmente mit ihren universellen Adaptern an die Adapter an der *Flowcell* (Abb. 7).

**Abb. 6 ChIP-seq Workflow**

Das Chromatin wird fixiert und fragmentiert. Mittels spezifischer Antikörper (orange) werden Histonmodifikationen (grün) gebunden und durch Beads separiert. Die gebundene DNA wird von dem Antikörper-Histon-Komplex getrennt und aufgereinigt. Die dsDNA wird repariert und mit *Stem-loop*-Adaptoren mit Replikationsstopp (Kreuz) ligiert. Der *Stem-loop*-Adapter bindet nur am 5'Ende der DNA und weist eine Lücke zum 3'Ende auf (schwarze Pfeilspitze). Durch die Verlängerung der DNA-Fragmente wird der *Stem-Loop*-Adapter am Replikationsstopp gespalten. Die DNA-Fragmente werden daraufhin mittels Primer, die Barcodes und *Flowcell* Adapter enthalten, amplifiziert. In der Illumina *Flowcell* kommt es durch *Bridgeamplification* zur Clusterbildung gefolgt von der Sequenzierung. Abbildung modifiziert nach (Park, 2009).

Durch die *Bridgeamplification* (Brückenamplifikation) jedes DNA-Fragmentes werden Cluster aus ssDNA gebildet. Danach hybridisieren Sequenzierungs-Primer und mittels *Sequencing by Synthesis* Technologie werden die Fluoreszenznukleotide durch die

Polymerase inkorporiert. Das Fluorophor wird angeregt und emittiert Licht. Durch die Clusterbildung wird das Farbsignal verstärkt. Dieses wird vom Illumina Sequenzierer fotografiert und ein Mikrobild erstellt (Abb. 7). Aus den Mikrobildern generiert der Base-caller Millionen von Read-Sequenzen pro Library (Abb. 8).

Je nach Anzahl der Zyklen entstehen unterschiedliche Read-Längen. Je länger die Reads sind, desto spezifischer können sie dem Referenzgenom zugeordnet werden. Obwohl das menschlichen Genom zu 52 % aus repetitiven Sequenzen besteht, können 30 bp lange Reads 80 % und 70 bp lange Reads sogar 89 % des Genoms detektieren (Rozowsky et al., 2009).

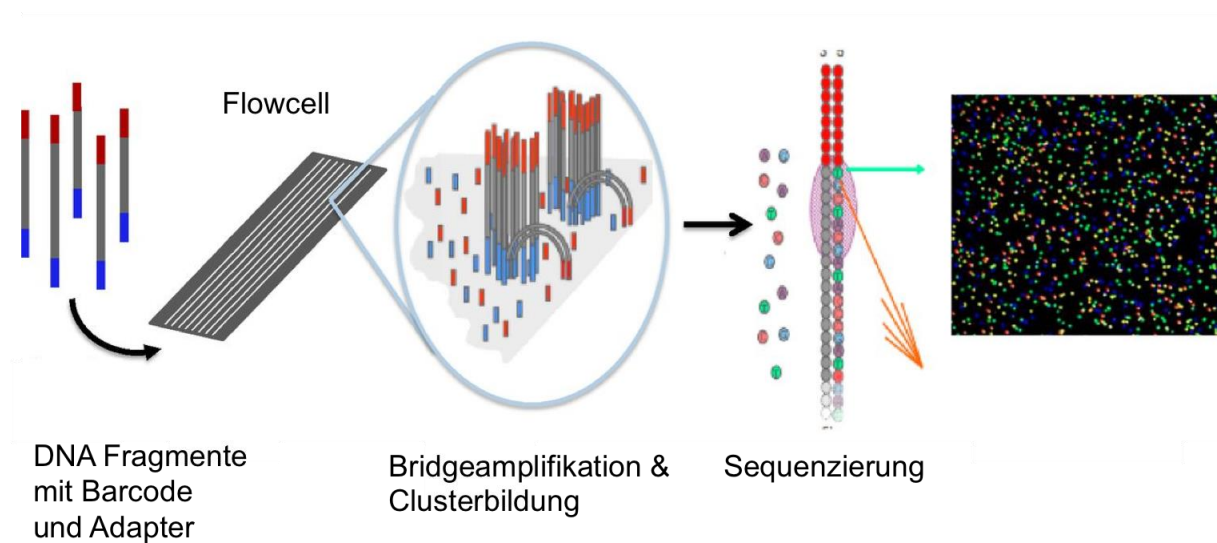


Abb. 7 Illumina Sequenzierung

Die DNA-Fragmente inklusive Adapter und Barcode (rot und blau) werden auf die Illumina *Flowcell* geladen. Dort binden die DNA-Fragmente an die vorhandenen Adapter der *Flowcell*. Das DNA-Fragment biegt sich mit dem nicht gebunden Ende an den nächsten Adapter und bildet eine Brücke (*Bridgeamplifikation*). Dadurch werden Cluster gebildet zur Verstärkung der Sequenzierungs-Signale. An jedem Single-DNA Strang bindet ein Sequenzierungs-Adapter, an dem die Sequenzierung durch Zugabe der vier Fluorophor-gekoppelten Basen gestartet wird. Die einzelnen Fluorophore werden über die gesamte *Flowcell* detektiert. Das Mikrobild (50x50 µm) einer *Flowcell* zeigt die gebundenen Fluorophore als Lichtsignale nach erfolgreicher Inkorporation eines Nukleotids durch die Polymerase. Abbildung modifiziert nach (Johnsen et al., 2013).

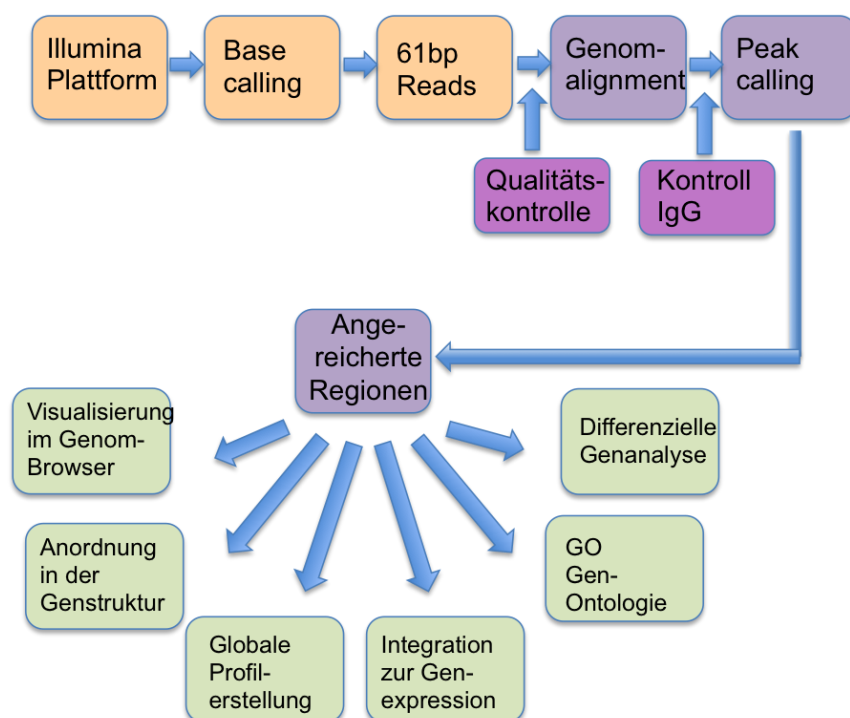


Abb. 8 ChIP-seq Analysen

Die Bilddaten der Illuminaplattform werden durch das Base-calling zu 61bp langen Reads verarbeitet. Die Reads jeder Library werden auf ihre Qualität überprüft und ggf. schlechte Read-Enden gekürzt. Die Reads werden daraufhin gegen das Mausgenom aligniert. Der Peak-Caller ermittelt die angereicherten Regionen (Peaks) nach Abzug der IgG-Kontrolle. Die Peaks können visuell auf Gen- und Read-Ebene analysiert werden. Weiterführende bioinformatische Analysen können Aufschlüsse über die Korrelation der Peaks mit der Genstruktur und der Genexpression geben. Ebenso können Modifikationsprofile, differenzielle Analysen und die zugehörige Gen-Ontologie-Analysen durchgeführt werden. Abbildung modifiziert nach (Park, 2009).

Zur Auswertung der Histonmodifikationen wurden die sequenzierten Reads gegen das Referenzgenom (Mausgenom mm10) aligniert. Dabei wurde jede Read-Sequenz mit dem Genom verglichen und der zugehörigen Chromosomenlokalisierung zugeordnet. Da für die Fragestellung dieser Arbeit nur die Histonmodifikationen innerhalb der Genstrukturen von Interesse sind, und nicht die der repetitiven Sequenzen, wurden die Read-Sequenzen, die mehrfach im Genom binden würden, verworfen. Zudem wurden Duplikate, die durch den Amplifikationsprozess entstanden sind, subtrahiert. Alle Reads, die eine hohe Spezifität und Qualität aufweisen bilden die *Coverage* (Abdeckung des Genoms). Die Reads staffeln sich an spezifischen Genabschnitten zu Read-Profilen und bilden Peaks (Abb. 5). Diese Peaks können mit verschiedenen Algorithmen detektiert und dem nächstliegenden Genen zugeordnet werden. Die Anreicherungen der Reads in einem Peak

werden charakterisiert durch den *Enrichmentfactor* (Anreicherungsfaktor) und die *Read-Density* (Read-Dichte).

Somit können die dynamischen Veränderungen der Histonmodifikationen während der Differenzierung verschiedener Zelltypen verglichen werden (Abb. 8).

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die systematische Analyse der epigenetischen Regulation der Chondrozytendifferenzierung während der enchondralen Ossifikation.

Die Knochen, die während der enchondralen Ossifikation gebildet werden, entstehen über eine Knorpelzwischenstufe. Ein essentieller Schritt ist die geordnete Differenzierung von proliferierenden zu hypertrophen Knorpelzellen, denn nur diese können durch Knochen ersetzt werden. Zudem sind die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten ausschlaggebend für das Wachstum und die Länge der späteren Knochen. Es ist bereits bekannt, dass die Chondrozytendifferenzierung über ein komplexes Netzwerk von regulatorischen Molekülen, wie Transkriptions- und Signalfaktoren, reguliert wird (Wuelling et al., 2013; Wuelling und Vortkamp, 2010). Es ist jedoch nur wenig über die epigenetischen Veränderungen während des Prozesses der Chondrozytendifferenzierung bekannt.

Daten aus unserem Labor konnten eine globale Änderung der Histonacetylierung während der Chondrozytendifferenzierung *in vitro* nachweisen (Masterarbeit Thiesen A.M., 2012). Zudem zeigte sich, dass die Mutation des Chondrozyten-regulierenden Transkriptionsfaktors *Trps1*, zur Reduktion der Hdac-Aktivität und damit zu einer erhöhten Histonacetylierung führt (Wuelling et al., 2013).

Um die epigenetischen Veränderungen während der Chondrozytendifferenzierung zu untersuchen, sollten mit Hilfe von transgenen Mäusen proliferierende und hypertrophe Chondrozyten von E13.5 bzw. E14.5-15.5 Embryonen isoliert werden. Dazu sollten transgene Mäuse genutzt werden, die *Yellow Fluorescent Protein* (YFP) in allen proliferierenden Chondrozyten unter der Kontrolle des Collagen 2 Promotors (*Col2a1-Cre, R26R-eYFP*) bzw. in allen hypertrophen Chondrozyten unter der Kontrolle des Collagen 10 Promotors (*Col10a1-Cre, R26R-eYFP*) exprimieren. Die YFP-positiven Chondrozyten sollten mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) isoliert werden und die Veränderungen der Histonmodifikationen mittels ChIP-seq untersucht werden. Zur umfangreichen Analyse sollten sowohl aktivierende Histonmodifikationen wie H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 als auch reprimierende Histonmodifikationen wie H3K9me3 und H3K27me3 untersucht werden (Wang et al., 2008).

Als erstes sollten Anreicherungsprofile der einzelnen Histonmodifikationen an Chondrozyten-spezifischen Genen untersucht werden. Zur Bestätigung von

aktiv-transkribierten Genen sollte eine Kombination der vier aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 genutzt werden. Zusätzlich sollten Enhancer-Strukturen über die Acetylierung von H3K27 unabhängig von der TSS analysiert und mit bereits publizierten Sox9 ChIP-seq Daten verglichen werden (Ohba et al., 2015). Dabei wird die Anreicherung von Sox9 zur Identifikation von Enhancern verwendet (Ohba et al., 2015). Um reprimierte Gene zu identifizieren sollten die Marker H3K9me3 und H3K27me3 genutzt werden. Weitere differentielle Analysen wie Gen Ontologie (GO) und Signalweg Analysen sollten herangezogen werden, um noch unbekannte Funktionen während der Differenzierung nachzuweisen.

Zudem sollte nicht nur auf Gen-Ebene sondern global die Histonmodifikations-Profile zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten analysiert werden. Um mögliche globale Änderungen zu erkennen, sollten Profile mit denen von undifferenzierten, embryonalen Stammzellen (ES) verglichen werden.

Mit diesem Ansatz sollte der Einfluss von epigenetischen Markierungen und deren Änderung im Verlauf der Knorpelentwicklung und ihre Veränderung in verschiedenen Differenzierungsschritten aufgeklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die für diese Arbeit verwendeten wurden, stammen von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Taufkirchen), Chemikalien von anderen Firmen sind extra aufgelistet.

Chemikalien	Firma
Agarose	Serva (Heidelberg)
Collagenase NB4	Serva (Heidelberg)
Direct PCR Tailprep	Peqlab (Erlangen)
DMEM:F12	Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
dNTPs	Thermo Scientific (Dreieich)
DNA Marker 100bp	Thermo Fisher Scientific (Bonn)
1x DPBS	Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
DPX-Mounting Medium	Fluka (Deisenhofen)
Ethidiumbromid	Calbiochem (Bad Soden)
FCS (fötales Kälberserum)	PAN-Biotech (Aidenbach)
HBSS	Gibco/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
K.O.-DMEM	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Protease Inhibitor Cocktail	Calbiochem (Bad Soden)/ Merck Millipore (Darmstadt)
Tissue Tek O.C.T. Compound Einbettmedium	Sakura Finetek Europe (Alphen am Rhein, NL)
Trypsin	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firmen
15 / 50 ml Falcons	Corning (Amsterdam)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Filterereinheit 0,45 µm/0,22 µm	Whatman (Dassel)
Objektträger (SuperfrostPlus)	Roth (Karlsruhe)
Zellkulturflaschen	Nunc (Zürich)
Zellsiebe (falcon cell strainer, 70 µm)	BD Biosciences Falcon (Heidelberg)

3.1.3 Antikörper

Antikörper	Firma
αH3	Abcam
αH3K4me3	Diagenode
αH3K9ac	Abcam
αH3K9me3	Diagenode
αH3K27ac	Diagenode
αH3K27ac	Abcam
αH3K27me3	Diagenode
αH3K36me3	Diagenode
αP300	Santa Cruz
αRNA Pol II S2	Abcam
αRNA Pol II S5	Abcam
αRNA Pol II CTD	Abcam
IgG	Diagenode

3.1.4 Genotypisierungsprimer

Primer	Primersequenzen
Bac-Col10-Cre-P1 WT (fw)	5' TTT AGA GCA TTA TTT CAA GGC AGT TTC CA 3'
Bac-Col10-Cre-P4 (rev)	5' TTT AGA GCA TTA TTT CAA GGC AGT TTC CA 3'

Bac-Col10-Cre-P5 (rev)	5' AGG CAA ATT TTG GTG TAC GG 3'
Cre-Rekombinase (for)	5' GAG TGA TGA GGT TCG CAA GA
Cre-Rekombinase (rev)	5' CTA CAC CAG AGA CGG 3'
Rosa-YFP Mut	5' AAG ACC GCG AAG AGT TTG TC 3'
Rosa-YFP Common	5' AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT3'
Rosa-YFP WT	5'GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG 3'

3.1.5 Geräte

Gerät	Firma
Biorupter	Diagenode
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Kamera	Spot23.0 Diagnostic instruments
Gel-Dokumentationsanlage	INTAS
Heizblöcke	Eppendorf Thermomixer compact
Kryotom	HM560; Microm (Walldorf)
Mikroliterpipetten	Eppendorf
Mikrowelle	Sharp
MilliQ-Anlage	Millipore
PCR-Geräte Mastercycler epgradientS	Eppendorf
PCR-Geräte Thermocycler T3000	Biometra
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
StepOne Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Stereomikroskop MZ FLIII	Leica
Sterilbank HERAsafe, MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	BDK
Stromquelle Consort EV 231	Peqlab
Thermomixer	Eppendorf
Vortex	Scientific Industries Mettler Toledo PL 3002 (max 3100 g)
Waagen	Mettler Toledo AL 54 (max 51 g, min 0,01 g)

Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5810R
	Eppendorf Centrifuge 5417C
	Eppendorf Centrifuge 5415D

3.1.6 Software

Software	Hersteller	Version
Excel	Microsoft	14.2.5
FlowJo	FlowJo, LLC	10.0.00003
Intas	GDS	3.22
MetaMorph	Molecular Devices	6.3r6
Photoshop	Adobe	11.0
Powerpoint	Microsoft	14.5.2
Spot Advanced	Diagnostic Instruments	4.6
Strand NGS	Avadis	2.5.1

3.1.7 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit den Chemikalien der Firmen Roth GmbH, Merck und AppliChem GmbH hergestellt. Hersteller anderer Chemikalien wurden gesondert aufgelistet. Alle Pufferlösungen wurden mit Milli Q™ gereinigtem Wasser angesetzt und steril filtriert.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
FACS-Puffer	2 mM EDTA
	1 % FCS
	PBS
Orange-G Ladepuffer (6x)	30 % Glycerol
	0,1 % Orange G
Penicillin/Streptomycin-Lösung	50 U/ml Penicillin
	5 µg/ml Streptomycin
	0,85 % NaCl
1x PBS (Phosphat buffered saline)	8 g NaCl

	0,2 g Potassium chloride
	1,44 g Na ₂ HPO ₄
	0,2 g KH ₂ PO ₄
	1 l H ₂ O
Proteinase K-Lösung	auf 400 ml:
	8 mg Proteinase K
	20 ml 1 M Tris pH 7,5
	4 ml 0,5 M EDTA
TAE	40 mM Tris-Base
	10 mM EDTA
	pH 8,0 (Essigsäure)
TE	10 mM Tris pH 8,0
	1 mM EDTA
1x TBST pH 7.4	1 x Tris + 0.3 % Tween20
10x Trypsin	0.5 % Trypsin, 0.2 % EDTA-4Na
1x Trypsin	1:10 in 1 x DPBS
X-Gal Waschpuffer	2 mM MgCl ₂
	0,01 % Natriumdeoxycholat
	0,02 % NP40
	in 1 xPBS
X-Gal Färbelösung	2 mM MgCl ₂
	0,01 % Natriumdeoxycholat
	0,02 % NP40
	5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ x 3 H ₂ O
	5 mM K ₃ Fe(CN) ₆
	0,1 % X-Gal
	in 1 x PBS
X-Gal Stammlösung	50 mg/ml in DMSO

3.1 Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken mit HEPA-Filtern durchgeführt. Alle verwendeten Materialien für Zellkulturarbeiten sind von der Firma Eppendorf und sind gammasterilisierte Einwegmaterialien.

3.1.1 Zellkultur

3.1.1.1 Embryonale Stammzellkultur

Die embryonalen Stammzellenlinie CCE (Robertson et al., 1986) wurde in K.O.-DMEM, 1 % PenStrep, 15 % FCS, 0,2 % Mouse rekombinant Leukemia Inhibitor Faktor 10 ng/ml, 1 % L-Glutamin, Monothioglycerol (MTG) $1,5 \times 10^{-4}$ M auf gelatinisierten T25 Flaschen kultiviert. Zur Gelatinisierung der Oberfläche wurden die Zellkulturflaschen mit einer 0,1 %igen Gelantine/PBS-Lösung für 30 min inkubiert und der Überstand anschließend verworfen. Täglich wurden die ES Zellen mit neuem ES-Medium gefüttert. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Flaschen von Sarstedt (Nümbrecht). Die Inkubation der Zellen erfolgte in Brutschränken bei 37°C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Die ES-Zellen wurden alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden sie mit 1x DPBS (37 °C) gewaschen, daraufhin mit 1x Trypsin befeuchtet, dieses direkt wieder abgesaugt und die Flasche anschließend für 2 min bei 37 °C inkubiert. Die Protease-Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe von ES-Zellmedium gestoppt. Die ES-Zellsuspension wurde 5 min bei 270 g zentrifugiert und das Zellpellet in ES-Zellmedium aufgenommen und auf eine Endkonzentration von 1×10^5 Zellen pro Flasche gesplittet. Die CCE Stammzelllinie wurde freundlicherweise von Hannes Klump, Transfusionsmedizin, Uniklinikum Essen bereitgestellt.

3.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Embryonalen Stammzellen

Es wurden ca. 3×10^6 ES-Zellen pro Vial eingefroren. Dazu wurden die ES-Zellen wie oben beschrieben trypsinisiert und das Pellet in vorgekühltes Einfriermedium (90 % FCS + 10 % DMSO) aufgenommen und anschließend bei -80 °C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Vials im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und in 5 ml warmes ES-Medium überführt. Zur Entfernung des Einfriermediums wurden die Zellen für 5 min bei

270 g zentrifugiert und das Pellet anschließend in ES-Medium resuspendiert. Die Kultivierung erfolgte in gelatinisierten T25 Flaschen.

3.1.2 Charakterisierung transgener Mäuse

3.1.2.1 Transgene Mäuse

Die Mäuse wurden nach der Quarantänestation im Zentralen Tierlaboratorium des Universitätsklinikums Essen zur Zucht und Haltung in die Maushaltung der Universität Duisburg-Essen gebracht, wo sie nach gentechnologischen und tierschutzrechtlichen Bestimmungen gehalten wurden.

Zur Analyse von proliferierenden Chondrozyten wurden *Col2a1-Cre* Mäuse (Ovchinnikov et al., 2000) mit *ROSA26^{fl/fl} YFP* Mäusen (JAX strain: *B6.129X1Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J*) gekreuzt.

Zur Analyse von hypertrophen Chondrozyten wurden *Bac-Col10-Cre* Mäuse (Gebhard et al., 2008) mit *ROSA26^{fl/fl} YFP* Mäusen (JAX strain: *B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP)Cos/J*) gekreuzt. Die Elterntiere wurden mit Hilfe einer PCR genotypisiert und die Embryonen mittels endogenem YFP Fluoreszenzsignal analysiert. Zur frühen Detektion der *Bac-Col10-Cre* Expression wurden die *Bac-Col10-Cre* Mäuse zusätzlich mit *R26R-LacZ (Gt(ROSA)26Sor^{tm1Sor})* Reporter Mäusen gekreuzt (Soriano, 1999). Die *Bac-Col10-Cre* Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus von der Mark zur Verfügung gestellt.

Um die Mausembryonen zu einem bestimmten Embryonalstadium zu gewinnen, wurde jeweils ein Männchen mit zwei Weibchen eines bestimmten Stammes verpaart. Durch Befruchtung des Weibchens entsteht am darauffolgenden Tag ein Vaginalplug. Der Tag des Plugs wird als Embryonalstadium E0.5 festgelegt. Zum gewünschten Embryonalstadium wurde das Muttertier durch zervikale Dislokation getötet und die Embryonen aus dem Uterus freipräpariert.

3.1.2.2 Präparation genomischer DNA

Zur Genotypisierung der transgenen Mäuse wurden Schwanzspitzenbiopsien entnommen und mit 200 µl Direct PCR-Tailprep Lösung und 4 µl Proteinase K [10 mg/ml] bei 55 °C ÜN inkubiert. Die Direct PCR-Tailprep Lösung in Kombination mit Proteinase K

lysiert das Gewebe und führt zur Freisetzung der genomischen DNA. Danach wurde die Proteinase K bei 85 °C für 45 min inaktiviert.

3.1.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können bestimmte Genabschnitte amplifiziert und mittels Agarose Gelelektrophorese visualisiert werden. Die Methode beruht auf der Polymeraseaktivität der Taq Polymerase, ein Enzym aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus* mit der Besonderheit auch bei hohen Temperaturen aktiv zu sein. Um bestimmte Genabschnitte zu amplifizieren benötigt die Taq Polymerase spezifischen Primer (Oligonukleotide), die mit der zu amplifizierende DNA-Sequenz hybridisieren. Die Primer werden durch den Einbau mit dNTPs (Desoxyribonucleosidtriphosphat) durch die Taq-Polymerase verlängert und somit die gewünschte Gensequenz repliziert.

Zur Herstellung eines geeigneten Reaktionsmileu wird ein 10x Taq Puffer zur Einstellung des optimalen Ionenhaushalt für die Taq Polymerase und Millipore Wasser zur Bildung eines Reaktionsvolumen benötigt. Das DMSO (Dimethylsulfoxid) unterbindet dabei die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA und der Primer. Die DNA wird denaturiert damit die forward- und reverse-Primer spezifisch an jeweils einen DNA-Strang des gewünschten Genabschnitts hybridisieren können. Die dNTPs werden als Energielieferant (Abspaltung von Pyrophosphat) und zur Verlängerung der Primer als Desoxyribonukleosidmonophosphate genutzt. Dabei werden drei grundlegende Schritte zyklisch wiederholt. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 95 °C. An die Einzelstränge der DNA werden anschließend die spezifische Primer anlagert (Annealing), wodurch die zu amplifizierende Sequenz eingegrenzt wird. Ausgehend von den Primern synthetisiert die Taq DNA-Polymerase einen DNA Doppelstrang komplementär zur vorhandenen Matrize bei 72 °C (Elongation). Daraufhin beginnt der Zyklus erneut. Die Annealing-Temperatur sowie die Elongationszeit und die Anzahl der Zyklen wurden den Primern angepasst.

Bac Col10-Cre:

		PCR Programm	
H ₂ O	19,7 µl	94 °C 5 min	
10x Taq-Puffer	2,5 µl		
DMSO	1,0 µl	94 °C 30 s	} 35 Zyklen
P1 (100 mM)	0,2 µl	58 °C 1 min	
P4 (100 mM)	0,1 µl	72 °C 1 min	

P5 (100 mM)	0,1 µl	
dNTPs (100 mM)	0,2 µl	72 °C 4 min
DreamTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	4 °C
DNA	2,0 µl	

Auswertung:

P1-P4: Wildtyp-Bande von 538 bp

P1-P5: Col10-Cre-Bande von 305 bp

Cre-Rekombinase:

H ₂ O	20,9 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
DMSO	1,25 µl
Cre Rec for (100 mM)	0,1 µl
Cre Rec rev (100 mM)	0,1 µl
dNTPs (100 mM)	0,2 µl
DreamTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA	2,0 µl

PCR Programm

94 °C 5 min	
94 °C 30 s	} 30 Zyklen
55 °C 30 s	
72 °C 45 s	
72 °C 5 min	
4 °C	

Auswertung:

Cre-Bande von 650 bp

Rosa-YFP:

H ₂ O	19,7 µl
10x Taq-Puffer	2,5 µl
DMSO	1,0 µl
Rosa-YFP common (100 mM)	0,2 µl
Rosa-YFP WT (100 mM)	0,1 µl
Rosa-YFP mut (100 mM)	0,1 µl
dNTPs (100 mM)	0,2 µl
DreamTaq- Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA	2,0 µl

PCR Programm

94 °C 5 min	
94 °C 30 s	} 35 Zyklen
58 °C 1 min	
72 °C 1 min	
72 °C 4 min	
4 °C	

Auswertung:

Rosa-YFP-Bande von 320 bp

Wildtyp-Bande von 600 bp

3.1.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld und wird zur Visualisierung der DNA-Fragmentgrößenbestimmung nach Sonifizierung (siehe 3.1.3.2) und der Genotypisierung nach PCR (siehe 3.1.2.3) genutzt.

1 %ige Agarosegele wurden mit 1x TAE gegossen und zur Visualisierung der DNA mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die DNA wurde mit einer Orange G Ladepufferlösung zu einer 1x Orange G Endkonzentration versetzt. Die DNA-Fragmente wurden bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht (345 nm) fotografiert und die Größe der DNA Fragmente anschließend mit dem DNA-Marker verglichen.

3.1.2.5 Kryoschnitte

Zur Analyse der Collagen 2- und Collagen 10-Expression wurden Kryoschnitte von *Col2a1-Cre; ROSA26^{fl/fl} YFP*, *Bac-Col10-Cre; ROSA26^{fl/fl} YFP* und *Bac-Col10-Cre; R26R-LacZ* angefertigt. Dazu wurden die Extremitäten der Mausembryonen im Stadium E14.5 bzw. P1 (postnatal Tag 1) in 1x PBS entfernt und in Tissue Tek O.C.T. Compound Einbettmedium eingebettet. Die Extremitäten im Einbettmedium wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Blöcke wurden bei -18 °C (Klinge: -18 °C, Block: -16 °C) im Kryotom bei 4 µm Schnittdicke geschnitten und auf -18 °C kalte Glasobjektträger gezogen und kurz bei RT getrocknet.

3.1.2.6 Fluoreszenzfärbung (Dapi-Färbung)

Zur Expressionskontrolle des YFPs in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten wurden Kryoschnitte der Extremitäten angefertigt (siehe 3.1.2.5) und eine Zellkerngegenfärbung mit Dapi (4',6-Diamidin-2-phenylindol) (100 ng/ml) vorgenommen. Dazu wurden die Schnitte 2x mit 0,05 % PBT und 1x mit 1x PBS gewaschen. Darauf erfolgt die Zellkerngegenfärbung mit Dapi für 2 min. Dapi ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bevorzugt an AT reiche Regionen in der kleinen Furche der DNA bindet. Nach Anregung mit ultravioletterem Licht (358 nm) fluoresziert Dapi im sichtbaren,

blauen Bereich mit einem Emissionsmaximum für doppelsträngige DNA bei 461 nm. Überschüssiges Dapi wurde für 5 min mit 1x PBS abgewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Moviol-Eindeckmedium für Fluoreszenz auf den Objektträgern fixiert.

Das YFP Signal wird bei 514 nm angeregt und erreicht bei 527 nm das Emissionsmaximum. Die Auswertung wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M Zeiss) und mit Hilfe der Auswertungssoftware MetaMorph durchgeführt (Exposure Zeiten: 10x: Dapi = 300 ms; GFP = 5000 ms; RedFP = 300 ms; 20x: Dapi 100 ms, GFP: 1000 ms; RedFP 150 ms; 63x: Dapi 50 ms, GFP: 200 ms; RedFP 100 ms).

3.1.2.1 β -Galaktosidase Färbung

Zur Analyse der *Cre*-Aktivität wurden *Bac-Col10-Cre* Mäuse mit *R26R-LacZ* Reporter Mäusen gekreuzt (siehe 3.1.2.1) und die Embryonen zum Zeitpunkt E14.5 und E17.5 (Kontrollembryonen) sektioniert. Für Kryoschnitte wurden die Extremitäten der *Bac-Col10-Cre; R26R-LacZ* Mäuse in 1x PBS präpariert und 1 h mit 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Für die Ganzkörperfärbung wurde die Haut der E17.5 Embryonen in 1x PBS entfernt und über Nacht mit 4 % PFA bei 4 °C fixiert. Daraufhin wurde das Gewebe 3 x in X-Gal-Waschpuffer gewaschen und anschließend bei 37 °C über Nacht in der X-Gal Färbelösung inkubiert. Das in der X-Gal Färbelösung enthaltene 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) wird durch das *LacZ*-kodierte Enzym β -Galaktosidase in den unlöslichen, blauen Farbstoff 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo umgesetzt. Nach ausreichender Farbgebung wurden die Embryonen in 1x PBS gewaschen und unter der Stereolupe fotografiert. Die Extremitäten wurden für 2 h in 30 % Sucrose schüttelnd bei 4 °C inkubiert um beim Einfrieren die Kristallbildung im Gewebe vorzubeugen. Danach wurden die Extremitäten in Tissue Tek O.C.T. Compound Einbettmedium eingebettet, in N₂ eingefroren und Kryoschnitte angefertigt (siehe 3.1.2.5) Die Schnitte wurden mit 100 % Methanol fixiert und mit 1x PBS gewaschen. Als Gegenfärbung wurde 2 min mit 0,1 % Kernechtrot inkubiert und die restliche Färbelösung mit 1x PBS entfernt. Die Schnitte wurden mit warmer Kaisergelantine eingedeckt und im Hellfeld fotografiert (100x Vergrößerung: Exposure 10; 200x Vergrößerung: Exposure:15).

3.1.3 Zellisolation und ChIP-seq

3.1.3.1 Analytisches und präparatives FACS (Fluorescence-activated cell sorting)

Für die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung wurden E13.5 bzw. E14.5 Embryonen der Mauslinie *Col2a1-Cre; ROSA26^{fl/fl} YFP* oder E14.5 bzw. E15.5 Embryonen der Mauslinie *Bac-Col10-Cre; ROSA26^{fl/fl} YFP* verwendet.

Die Knorpelanlagen der Embryonen wurden in 1x PBS durch das Entfernen von Haut, Muskeln, Kopf und innerer Organe freipräpariert und anschließend mit einer Schere zerkleinert. Das Vereinzeln der Zellen aus dem Gewebe erfolgte für 3 h bei E13.5-E14.5 Embryonen und 4 h bei E15.5 Embryonen in einer Verdauungslösung (Collagenase NB4, 0,6 U/ml; 1x Trypsin ohne EDTA; 5 %FCS; 1x PBS) bei 37 °C im Schüttelwasserbad. Danach wurde die Verdauungslösung durch die Zugabe von Zellkulturmedium (DMEM:F12 1:1, 10 % FCS, Pen/Strep) inaktiviert und die Zellsuspension durch ein 70 µm Zellsieb filtriert.

Die Zellen wurden 7,5 min mit 1 % Formaldehyd fixiert und daraufhin die Fixierung mit Glycin (0,05 mM) für 5 min gestoppt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 4 °C kalten DPBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 5 min, wurde das Zellpellet in FACS-Puffer mit 1x Protease Inhibitor resuspendiert und bei 4 °C gelagert.

Das fluoreszenzaktivierte Zellsortieren wurde im Uniklinikum Essen, in der Abteilung für Infektionsimmunologie bei Prof. Dr. Astrid M. Westendorf an einem BD FACS Aria II vorgenommen. Dabei wurde die Zellzahl der sortierten Zellen für die späteren ChIP-seq Versuche bestimmt. Mittels Reanalyse von 10.000 sortierten Zellen wurde die Anreicherung der YFP-positiven Zellen bestimmt. Die analytische Auswertung wurde mittels FlowJo 10.0 durchgeführt.

3.1.3.2 Chromatin Immunopräzipitation

1x10⁶ Col2a1-YFP positive E14.5 Chondrozyten bzw. 3,5x10⁵ Col2a1 E13.5 und Col10a1 YFP positive E14.5-E15.5 Chondrozyten wurden pro Antikörper (siehe Antikörperliste) verwendet. Für proliferierende Chondrozyten wurde jeder ChIP 3x bzw. für H3K9ac 4x wiederholt. Für die hypertrophen Chondrozyten wurde jeder ChIP 2x und für H3K9ac 3x wiederholt. Die Präzipitation erfolgte mit einigen Modifikationen mittels des True MicroChIP Kits (C01010130) von Diagenode.

Vor dem FACS wurden die Zellen bereits durch 1 % Formaldehyd fixiert. Dabei wurden die Histonproteine mit der DNA vernetzt (siehe 3.1.3.1). Die mittels FACS isolierten Zellen wurden mit 4 °C kalten 1x DPBS gewaschen, um die FACS-Pufferreste zu entfernen.

Für den ES-Zell ChIP wurden $3,5 \times 10^5$ Zellen 7,5 min mit 1 % Formaldehyd fixiert und 5 min mit Glycin (0,05 mM) gestoppt. Die Zellen wurden bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und anschließend mit 4 °C kalten DPBS gewaschen.

Mit den ES-Zellen und Chondrozyten wurde wie folgt fortgefahren: Die Zellen wurden ein weiteres Mal mit 1x HBSS und 1x Protease Inhibitor gewaschen und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei -80 °C gelagert, bis eine ausreichende Anzahl an Chondrozyten für einen ChIP-Ansatz gesammelt war. Für die Zelllyse von $3,5 \times 10^5$ Zellen wurden 42 µl Lt1 Lysis Puffer mit 1x Protease Inhibitor verwendet und nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei 4 °C mit 130 µl HBSS und 1x Protease Inhibitor aufgefüllt. Zur Chromatinfragmentierung wurden die Zellen 30 min im 30 s on/off Rythmus im Biorupter (Ultraschallbad) von Diagenode behandelt. Daraufhin wurden die lysierten Zellen für 10 min bei 4 °C und 13800 rpm zentrifugiert, um Zellmembran- und Organellreste von dem Chromatin zu trennen. Zur Fragmentgrößenbestimmung wurden $0,5 \times 10^5$ Zellen mit 10 µl Proteinase K (1 mg/ml) versetzt und für 2 h bei 65 °C und 400 rpm im offenen Eppendorfgefäß verdaut und aufkonzentriert. Die DNA-Fragmente wurden mittels eines 1%igen Agarosegels analysiert und durch einen DNA-Längenstandart (100-3.000 bp) verglichen.

Das gescherte Chromatin wurde 1:1 mit dem Ct1-ChIP-Puffer verdünnt und die spezifischen Antikörper (3.1.3) zugefügt. Für 1×10^6 Zellen wurden 5 µg bzw. für $3,5 \times 10^5$ Zellen 2,5 µg Antikörper verwendet. Für den Input wurde 1/10 des IP-Ansatzes als Positivkontrolle bei -80 °C eingefroren. Als Negativkontrolle dient der IgG Antikörper, um unspezifische Bindungen von spezifischen unterscheiden zu können. Die Antikörper wurden 16 h bei 4 °C rotierend inkubiert. Zur Immunopräzipitation der DNA-Histon-Komplexe wurden 11 µl der magnetischen Beads 2x mit tB1 Bead Waschpuffer gewaschen und je Immunopräzipitation 10 µl zum Antikörper-Chromatin-Mix hinzugefügt und 4 h bei 4 °C rotierend binden gelassen. Um nur spezifische Bindung der Antikörper und Beads zu gewährleisten, wurden die Chromatin-Antikörper-Bead-Komplexe mittels steigenden Salzkonzentrationen gereinigt. Dazu wurden die Komplexe mit je 200 µl Waschpuffer 1-4 je 4 min rotierend bei 4 °C inkubiert und mit Hilfe des Magneten die unspezifischen Bindungen entfernt. Zur Aufhebung der Quervernetzung wurden die Beads durch Zugabe von 200 µl Et1 Puffer entfernt. Der Input wurde ebenfalls

auf 200 µl mit Et1 Puffer aufgefüllt und 30 min rotierend bei RT inkubiert. Nach kurzem zentrifugieren wurden die Beads mittels Magnet aus der Lösung entfernt und der Überstand mit 8 µl Et2 Puffer versetzt und 4 h schüttelnd bei 65 °C und 1300 rpm inkubiert. Der Et2 Puffer führte zum Proteinverdau von den DNA-gebundenen Proteinen. Die DNA wurde daraufhin mittels DiaPure Säulen (C03040001 Diagenode) aufgereinigt. Dazu wurde die DNA-Lösung 1:5 mit DNA-Binding-Puffer verdünnt, auf die Säulen gegeben und 30 s bei 10000 g zentrifugieren lassen. Dabei wurde die DNA an die Silika-Säulen gebunden und die verdauten Proteinreste gewaschen. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde der Durchfluss ein zweites Mal auf die Säule geladen. Darauf folgten zwei Waschschrte durch Zugabe von 300 µl ethanolhaltigem DNA-Waschpuffer für 30 s bei 10000 g. Zur Elution der DNA wurde zwei Mal 9 µl des Elution-Puffers für 5 min auf der Säule einwirken gelassen und bei 10000 g für 2 min in ein steriles Eppendorfgefäß zentrifugiert.

Die Analyse der DNA-Konzentrationen und der Fragmentierung erfolgte mittels Agilent Technologies, 2100 expert, High Sensitivity DNA Assay im Biochip-Labor, IFZ Essen von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass. Die DNA wurde bis zur Library Präparation bei –80 °C gelagert.

3.1.3.3 Erstellen der Library

Die Library wurde mittels MicroPlex Library Preparation™ Kits (C05010010) und der darauffolgenden Version MicroPlex Library Preparation™ Kit V2 (C05010012) der Firma Diagenode durchgeführt.

Die Library Präparation wird benötigt, um DNA-Fragmente zu reparieren, Adapter und Barcodes zu ligieren und eine ausreichende Menge an DNA-Fragmenten zu amplifizieren um das *Next Generation Sequencing* zu ermöglichen.

Aus dem ChIP Ansatz (siehe 3.1.3.2) wurden 10 µl DNA zur Template Präparation verwendet. Durch Zugabe von 2 µl Template Preparation Buffer und 1 µl Template Preparation Enzym pro ChIP, wurden Brüche in Einzelsträngen und überhängende Enden durch Auffüllen der dsDNA während der Inkubation (siehe 3.1.3.3.1) im Eppendorfcycler repariert. Zur Library Synthese wurden 1 µl Library Synthesis Buffer und 1 µl Library Synthesis Enzym zum Ansatz pipettiert und 20 min bei 55 °C im Cyclyer inkubiert. Dies führte zur Blunt-end Ligation der *Stem-loop* Adapter an beide 3' Enden der dsDNA. Der *Stem-loop* Adapter besitzt eine spaltbare Replikationsstoppstelle und einen Loop-

Überhang am 5'Ende zur Vermeidung von Primerdimeren. Durch die Elongation des 3'Endes der DNA wird der *Stem-Loop*-Adapter an dem Replikationsstopp gespalten.

Während der Library Amplifikation werden die Primer mit Barcodes an die Adapter gebunden und die DNA-Fragmente amplifiziert. Dazu wurden 25 µl Library Amplification Buffer, 1 µl Library Amplification Enzym und 4 µl Nuclease Free Water zum Ansatz hinzugefügt. Die Amplifikationszyklen wurden von der DNA Konzentration abhängig gemacht und betrugen 8-18 Zyklen (siehe 3.1.3.3.2). Die DNA Konzentrationen wurden mit Agilent Technologies, 2100 expert, High Sensitivity DNA Assay im Biochip-Labor, IFZ Essen von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass bestimmt. Nach der Amplifikation wurden die DNA Konzentrationen ein weiteres Mal mittels Agilent und zusätzlich durch die KAPA PCR im Biochip-Labor, IFZ Essen von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass bestimmt, um das äquimolare Poolen zu ermöglichen. Nach dem äquimolaren Poolen erfolgte die Aufreinigung mittels Agencourt® AMPure®XP Beckman Coulter Beads (A63880). Der äquimolare DNA-Pool wurde 1:1 mit den DNA-Beads gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Mit frisch angesetztem 80 %igen Ethanol wurden die DNA-Bead-Komplexe 2x gewaschen. Um das Ethanol verdampfen zu lassen, wurde das Eppendorfgefäß offen bei 37 °C 2-3 min inkubiert. Das Lösen der DNA von den Beads erfolgte durch zweimalige Zugabe von 25 µl TE-Puffer und je 10 minütiger Inkubation. Die Beads wurden daraufhin mittels Magneten entfernt und die DNA bei -80 °C eingefroren. Die endgültige Librarykonzentration wurde zum Beladen der *Flowcell* mittels Agilent und KAPA PCR bestimmt und im Illumina Analyser, Highseq 2500, im Biochip-Labor, IFZ Essen von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass sequenziert.

3.1.3.3.1 Cyclor Programme zur Library Präparation

Template Präparation:

22 °C	25 min
55 °C	20 min
4 °C	

Library Synthese:

22 °C	40 min
4 °C	

Library Amplifikation:

72 °C	3 min	4 Zyklen
85 °C	2 min	
98 °C	2 min	
98 °C	20 s	
67 °C	20 s	4 Zyklen
72 °C	40 s	
98 °C	20 s	
72 °C	50 s	8-18 Zyklen abhängig vom DNA Gehalt nach Agilent Messung (siehe 3.1.3.3.2)
4 °C		

3.1.3.3.2 Anzahl der Amplifikationszyklen

DNA Input (ng)	Anzahl der Zyklen
50	5
20	6
10	7
5	8
2	10
1	11
0,2	14
0,05	16

3.1.3.3.3 Illumina Barcodesequenzen

Index	Sequenz
1	ATCACGTT
2	CGATGTTT
3	TTAGGCAT
4	TGACCACT
5	ACAGTGGT
6	GCCAATGT
7	CAGATCTG
8	ACTTGATG
9	GATCAGCG
10	TAGCTTGT
11	GGCTACAG
12	CTTGTA CT

3.1.3.4 Illumina *Next Generation Sequencing* (NGS)

Die Illumina Sequenzierungs-Technik basiert auf der Bindung von DNA-Fragmenten an eine *Flowcell* mit anschließenden *Bridgeamplification* durch PCR und einer Sequenzierung durch Synthese. Dabei entstehen Millionen von sequenzierten Sequenzen (Reads), die der DNA-Fragmentenden entsprechen.

Die *Flowcell* ist ein Glasobjekträger mit mehreren Spuren, auf deren Oberfläche zwei unterschiedliche Adaptersequenzen (Oligonukleotide) zur Hybridisierung der DNA-Fragmentenden vorhanden sind. Während der Library Präparation wurden die entsprechenden Adapter zur Hybridisierung an die DNA-Fragmente ligiert. Die dsDNA wurde durch 2 N NaOH denaturiert. Die ssDNA-Fragmente hybridisieren an die Adapter der *Flowcell*, dabei fungieren die Adapter als Primer für die PCR. Daraufhin folgt eine erste Verlängerung des hybridisierten DNA-Fragments. Der Doppelstrang wird wieder gespalten und die Originalmatrize entfernt. Der Einzelstrang biegt sich mit seinem freien, nicht gebundenen Ende, zum zweiten Adapter und bildet eine Brücke zur sogenannten *Bridgeamplification* (Brückenamplifikation). Der zweite Adapter dient ebenfalls als Primer zur Verdopplung des Strangs. Die doppelsträngige Brücke wird daraufhin wieder denaturiert wodurch zwei kovalent-gebundene DNA-Einzelstränge entstehen. Dieser Vorgang wiederholt sich bis ein Cluster aus ca. 1000 Kopien entstanden ist. So entstehen über 150 Millionen Cluster pro *Flowcell*. Beim letzten *Bridgeamplification*-Schritt wird der Reverse-Strand entfernt und nur der Forward-Strand wird sequenziert. Dazu hybridisiert ein Sequenzierungs-Primer an das freie obere DNA-Ende und die Fluoreszenznukleotide werden hinzugefügt. Durch die Inkorporation eines Fluoreszenznukleotids durch die Polymerase wird das *Next Generation Sequencing* (NGS) eingeleitet. Während des NGS findet direkt beim Einbau der Nukleotide die Sequenzierung statt durch die *Sequencing by Synthesis* Technologie. Jedes Nukleotid: Adenin, Guanin, Cytosin und Thymidin ist mit einem spezifischen abspaltbaren Fluorophor (rot, gelb, blau, grün) gekoppelt. Die Nukleotide besitzen zudem einen reversiblen 3'-N₂ Terminator, der den Einbau von nur einer Base pro Zyklus sicherstellt. Pro Sequenzierungs-Zyklus werden alle vier Basen zur Inkorporation bereitgestellt. Je nach DNA-Template wird ein Nukleotid eingebaut. Das Fluorophor, des Nukleotids, wird durch einen Laser angeregt und emittiert das Licht in einer bestimmten Wellenlänge. Durch die Bindung vieler, gleichfarbiger Nukleotide in einem Cluster wird das Farbsignal verstärkt. Der Illumina Sequenzierer fotografiert alle Farbsignale der *Flowcell*, wobei 1200 Mikrobilder pro Zyklus verarbeitet werden (Abb. 7).

Daraufhin werden die Fluorophore und die Terminatorsequenz abgespalten und die *Flowcell* ausgewaschen, um mit einen neuen Zyklus zu beginnen. Der Base-caller generiert aus den Mikrobildern Millionen von Read-Sequenz pro Library, diese Read-Sequenzen werden als FASTQ Daten gespeichert (Abb. 8).

Die Sequenzierung erfolgte mittels HiSeq2500 Illumina Genome Analyser im Biochip-Labor, IFZ Essen von PD Dr. Ludger Klein-Hitpass.

3.1.4 ChIP-seq Rohdaten und Peak-Detektion

3.1.4.1 Bearbeitung der ChIP-seq Rohdaten

Die 61 bp DNA Reads von FASTQ Rohdaten wurden mit dem StrandNGS Programm (Strand Genomics Co) analysiert.

In diesem Ansatz wurden 61 bp lange Reads sequenziert. Diese Reads unterliefen einer Qualitätskontrolle bevor sie aligniert wurden. Dazu wurde der *Phred quality score* und die Verteilung der Basen pro Read analysiert. Ein *Phred score* von über 20 wurde als Qualitätsstandart der Sequenzierung verwendet, dabei bedeutet ein *Phred score* von 20, dass mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 in 100 Basen ein Fehler in der Sequenzierung auftrat. Die Enden der Reads sind Technik-bedingt anfälliger für Fehler und wurden bei schlechtem *Phred quality score* (>20) getrimmt.

Das DNA Alignment wurde gegen das mm10 Mausgenom mit UCSC Annotation vorgenommen.

Um die Read-Spezifität zu erhöhen, wurden nur geringe Basenunterschiede innerhalb der Read-Sequenz toleriert.

Pre-Alignment Qualitätskontrolle:

Set Alignment Parameter:

Minimum Percentage Identity:	90
Maximum Percentage Gaps:	5
Minimum match length:	50
Maximum number of matches reported per read:	1
Ignore reads with more than 1 valid match	

Set Trimming Parameters

Fixed trimming

Number of bases to trim from 3'end	1
Number of bases to trim from 5'end	1

Quality Trimming

Trim 3'end with average quality less than	20
---	----

Post alignment trimming

Trim poorly aligned portion at 3'end

Post-Alignment Qualitätskontrolle:**Filter by read metrics:**

- Remove non-primary multiply mapped reads	
- Remove reads with more than 1 match	
- Remove reads with average base quality below	20
- Remove reads with number of `Ns` above	0
- Remove reads with alignment score below	90
- Remove reads with mapping quality below	20
- Remove reads with failing vendor's QC	
- Remove reads with length less than	45

Filter on Duplicats**3.1.4.2 Peak-Detektion**

Zur Peak-Detektion wurde der Enriched region detection (ERD)-Algorithmus von StrandNGS verwendet. Dieser errechnet die 5-fache Read-Anreicherungen von Histonmodifikationen gegenüber des Kontroll IgGs. Es wurden zwei ERD-Settings verwendet, da zwischen breiten-hohen und breiten-flachen Peaks unterschieden werden muss.

Der Peak-Detektion-Algorithmus gibt die Chromosomenlokalisierung der Peaks, die Anzahl der Reads, den *Enrichment Factor* (Anzahl der Reads im Verhältnis zur Gesamtzahl der Reads), die Dichte der Reads in einem Peak und das dazugehörige Gen an. Alle Peak-Listen befinden sich auf der beiliegenden DVD.

ERD für breite-hohe Peaks (H3K9ac, H3K4me3 und H3K27ac)

Abzug der IgG reads

Parameters:

Enrichment factor	5
Window Size (bp)	200
Minimum reads in window	10
Window Slide Size (bp)	100
Minimum region size (bp)	200
Minimum reads in regions	15
Upstream padding distance for genes	5000

ERD* für breite-flache Peaks (H3K9me3, H3K27e3 und H3K36me3)

(Calling narrow and broad peaks from ChIP-Seq data in Strand NGS, Rohit Gupta et al., 2015 Strand Life Sciences)

Abzug der IgG reads

Parameters:

Enrichment factor	5
Window Size (bp)	400
Minimum reads in window	10
Window Slide Size (bp)	100
Minimum region size (bp)	200
Minimum reads in regions	10
Upstream padding distance for genes	5000

3.1.4.3 Einlesen publizierter Daten**3.1.4.3.1 Bearbeitung der Mikkelsen ChIP-seq Daten**

Die ES-ChIP Daten (CCE) dieser Arbeit wurden mit den publizierten Daten von Mikkelsen et al., 2007 verglichen. Dazu wurden die ChIP-seq Daten vom Geo NCBI Server (GSE 12241) heruntergeladen. Die Mikkelsen ES-ChIP (M-ES) Daten wurden mit 1x10⁸ murinen V6.5 embryonalen Stammzellen für H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3 und H3K36me3 angefertigt. Dafür wurden die M-ChIPs für H3K27me3 siebenmal, der H3K4me3 ChIP sechsmal, H3K9me3 und H3K36me3 je zweimal sequenziert. Alle Einzelexperimente wurden zusammen verrechnet. Die Read-Länge für H3K9me3,

H3K27me3 und H3K36me3 betrug 30 bp, für H3K4me3 34 bp und für die RNA-Pol II 45 bp. Die Rohdaten wurden prinzipiell wie in 2.14. prozessiert, allerdings wurden die Parameter der verkürzten Read-Länge angepasst.

Pre-Alignment Qualitätskontrolle mit Strand NGS:

Set Alignment Parameter:

Minimum match length: 25

Filter by read metrics:

- Remove reads with length less than 15

3.1.4.3.2 Bearbeitung der Sox9 Daten

Zur Bestätigung aktiven Enhancer in Chondrozyten wurden Daten eines Sox9 und RNA-Pol II S5 ChIP-seqs von Chondrozyten (Ohba et al., 2015) analysiert. Dazu wurden die Daten bei NCBI Geo GSE69109 heruntergeladen. Dieser ChIP wurde aus Rippen-Chondrozyten von P1 Mäusen angefertigt und stellt eine gemischte Population aus proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten dar. Die Rohdaten wurden wie in 2.14 beschrieben mit den gleichen Settings aligniert und entsprechend ihrer verkürzten Read-Länge (Sox9=63 bp, RNA-Pol II S5=32 bp, IgG=43 bp) bearbeitet (siehe unten). Die Peak-Detektion wurde mit MACS vorgenommen, da es sich um schmale, hohe Peaks des Transkriptionsfaktors bzw. der RNA-Pol II handelt. Bei der Peak-Detektion wurde nicht das IgG vom Datensatz abgezogen, da es aus einem anderen Experiment stammte.

Pre-Alignment Qualitätskontrolle mit Strand NGS:

Set Alignment Parameter:

Minimum match length: 25

Filter by read metrics:

- Remove reads with length less than 15

3.1.4.4 Korrelation zwischen biologischen Replikaten

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde auf Basis der zum Mausgenome (mm10) alignierten Reads, nach Prä- und Postalignment Qualitätskontrolle und Filterung der Read

metrisch und nach Abzug der Duplikate, in Kooperation mit der Bioinformatik der AG Hoffmann, Dr. Anja Lange, Universität Duisburg-Essen bestimmt. Zur Berechnung wurde eine Funktion in der Programmiersprache R (R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.) geschrieben, die neben den Basis-Paketen auf Funktionalitäten folgender Pakete zurückgreift:

-ShortRead (M. Morgan, S. Anders, M. Lawrence, P. Aboyoun, H. Pag\`es, and R. Gentleman (2009): "ShortRead: A Bioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data". *Bioinformatics* 25:2607-2608.)

-GenomicAlignments (Lawrence M, Huber W, Pag\`es H, Aboyoun P, Carlson M, et al. (2013) Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput Biol* 9(8): e1003118. doi:10.1371/journal.pcbi.1003118)

-GenomicRanges (Lawrence M, Huber W, Pag\`es H, Aboyoun P, Carlson M, et al. (2013) Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput Biol* 9(8): e1003118. doi:10.1371/journal.pcbi.1003118)

-rtracklayer (M. Lawrence, R. Gentleman, V. Carey: "rtracklayer: an (R) package for interfacing with genome browsers". *Bioinformatics* 25:1841-1842.)

-IRanges (Lawrence M, Huber W, Pag\`es H, Aboyoun P, Carlson M, et al. (2013) Software for Computing and Annotating Genomic Ranges. *PLoS Comput Biol* 9(8): e1003118. doi:10.1371/journal.pcbi.1003118)

Die Funktion implementiert die folgenden Schritte: Zunächst wurde für die zu korrelierenden Daten jeweils die Datei mit dem Alignment (Bam-Datei StrandNGS) eingelesen, Regionen im Genom, die empirisch eine Anfälligkeit für artifizielle Signale zeigen (ENCODE/modENCODE Project Consortium, *ENCODE Project Consortium. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. Nature. 2012 Sep 6;489(7414):57-74.* doi: 10.1038/nature11247,

[http://www.broadinstitute.org/~anshul/projects/mouse/blacklist/mm9-](http://www.broadinstitute.org/~anshul/projects/mouse/blacklist/mm9-blacklist.bed.gz)

[blacklist.bed.gz](http://www.broadinstitute.org/~anshul/projects/mouse/blacklist/mm9-blacklist.bed.gz) umgerechnet in mm10 Genomkoordinaten) wurden entfernt und für die verbleibenden genomischen Regionen wurde die *Coverage* (Genomabdeckung) in Fenstern (bins) von 5.000 Basenpaaren berechnet, welche zu 1.000.000 Basen normiert wurde.

Für die Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten (Karl Pearson (20 June 1895)

"Notes on regression and inheritance in the case of two parents," *Proceedings of the Royal Society of London*, **58**: 240–242). wurden nur solche Fenster berücksichtigt, die in mindestens einer Probe eine *Coverage* größer Null hatten.

Zur graphischen Darstellung der Korrelation wurden Funktionen des R-Pakets ggplot2 (H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009) verwendet.

3.1.5 Biologische Auswertungen der ChIP-seq Daten

3.1.5.1 Transkriptionell-aktive Gene

Um herauszufinden wie viele Gene eindeutig zur Transkription aktiviert wurden, wurden alle Gene, welche durch alle vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) markiert wurden, miteinander verglichen. Um gleiche statistische Vorraussetzungen zu schaffen, wurden jeweils zwei Datensätze von proliferierenden Chondrozyten mit den zwei Datensätzen der hypertrophen Chondrozyten verglichen.

3.1.5.2 Bivalente Gene

Gene werden als bivalente Gene bezeichnet, weil sie sowohl mit der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3, als auch mit der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me3 markiert sind. Zur Detektion von bivalenten Genen wurden die Genlisten von H3K4me3 und H3K27me3 in allen drei Zelltypen verglichen. Um den Regulationsmechanismus dahinter aufzuklären, wurden die bivalenten Gene der proliferierenden Chondrozyten auf Aktivität in hypertrophen Chondrozyten und die bivalenten Gene der hypertrophen Chondrozyten auf Aktivität in proliferierenden Chondrozyten untersucht. Dazu wurden Genlisten verglichen, die in einer Chondrozyten-Population alle vier aktivierenden Histonmodifikationen (3.1.5.1) aufwiesen und in der anderen Population als bivalent markiert wurden.

3.1.5.3 Enhancer-Detektion

Zur Detektion von Enhancern wurden die alignierten, metrisch behandelten und von Duplikaten entfernten Reads von H3K27ac, H3K9ac der ES-Zellen und Chondrozyten

sowie die Reads der publizierten RNA-Pol II und Sox9 (Ohba et al., 2015) verwendet. Um nur Regionen zu analysieren die außerhalb der TSS liegen, wurde auf Read-Ebene während der Peak-Detektion, die Reads der H3K9ac von den Reads der H3K27ac abgezogen. Dies bedeutet, dass nur eine 5-fache Anreicherung von H3K27ac über H3K9ac als Peak ermittelt wurde. Um Peaks auch Genen zuzuordnen, die weiter vom Gen entfernt liegen, wurde die Distanz (Gene padding) auf 10.000 bp erweitert. Die Peaks wurden mittels StrandNGS (overlap type) auf ihre Lokalisation in den Genstrukturen analysiert. Um den Enhancer-Peaks aktiven Gene zuordnen zu können, wurden die annotierten Gene nach Peak-Detektion mit durch H3K9ac markierten Genen des jeweiligen Zelltyps verglichen.

Zusätzlich wurden die Peak-Listen von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten jeweils mit der Peak-Liste von Sox9 verglichen (StrandNGS: *Compare two region lists*). Dabei werden die Koordinaten der angereicherten Region verglichen, wobei die Peakregionen überlappend sein müssen. Um daraufhin die Enhancer ihren Genen zuzuordnen und deren Aktivität zu bestimmen, wurden die überlappenden Regionslisten in Genlisten transferiert (StrandNGS: *Transfer regions to genes*). Diese Genlisten wurden mit den H3K9ac Genlisten der jeweiligen proliferierenden, hypertrophen Chondrozyten und ES Zellen verglichen. Die Chondrozytendaten wurden zusätzlich mit der Gen-Liste der RNA-Pol II S5 (Ohba et al., 2015) verglichen.

3.1.5.4 Signalweg Analysen durch StrandNGS

Mittels Signalweg Analyse wird eine Anreicherung von Genen innerhalb eines Signalwegs analysiert und eine Signifikanz dieser Anreicherung gegenüber der Gesamtzahl in diesem Signalweg befindlichen Genen errechnet. Dazu wurden die Genlisten der aktivierenden Histonmarkierungen herangezogen. 459 Signalwege wurden mittels (*Wikipathways*, *Biocyc*) StrandNGS untersucht. Es wurden nur Gene verwendet, die alle aktivierenden Histonmarkierungen trugen. Dazu wurden jeweils die Peak-Listen von H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 eines Datensatzes verglichen und die daraus resultierenden identischen Gene mit den identischen Genen des zweiten Datensatzes verglichen. Die Signifikanz wurde mit $p < 0,05$ berechnet.

3.1.5.5 Gen Ontologie (GO)-Analyse durch StrandNGS

Mittels GO-Analyse werden Genanreicherungen innerhalb von funktionellen Gengruppen analysiert. Sind die analysierten Gene in einer Gengruppe überrepräsentiert ermittelt die GO die Signifikanz. Dieses wird aus der Anzahl der annotierten Gene (Input) im Verhältnis zur Genanzahl in einem GO-Term berechnet. Nur GO-Terms mit einem $p < 0,05$ wurden berücksichtigt.

Um heraus zu finden, ob die aktivierten Gene der beiden Chondrozytentypen Chondrozyten-spezifische Anreicherungen in bestimmten Gengruppen aufweisen, wurde die GO-Analyse mit StrandNGS durchgeführt. Dazu wurden die beiden Genlisten der exklusive in proliferierenden und in hypertrophen Chondrozyten identifizierten Gene verwendet (3.1.5.4).

Die GO-Analyse für aktive Enhancer wurde genutzt, um differentielle Nutzung der Enhancer aufzuklären. Dazu wurden Genlisten, nach Vergleich der aktiven Gene mit H3K9ac, verwendet. Dabei wurden die aktiven Enhancer der proliferierenden mit den der hypertrophen Chondrozyten verglichen. Die daraus resultierenden drei Listen (Enhancer nur von proliferierenden Chondrozyten, Enhancer nur von hypertrophen Chondrozyten und gemeinsam detektierte Enhancer) wurden zur GO-Analyse verwendet (Abb. 34b, 3.1.5.3).

Ebenfalls wurde eine GO-Analyse nach Sox9 Enhancer-Detektion vorgenommen. Enhancer, die sowohl eine Sox9 Binding als auch eine Aktivität am nächstliegenden Gen nachweisen könnten, wurden in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten verglichen und die daraus resultierenden drei Genlisten analysiert (Abb. 35c, 3.1.5.3).

Zur Aufklärung von bivalenten Genen wurden die bivalenten Gene der proliferierenden Chondrozyten auf Aktivität in hypertrophen Chondrozyten und die bivalenten Gene der hypertrophen Chondrozyten auf Aktivität in proliferierenden Chondrozyten untersucht. Dazu wurden nur Genlisten verwendet, die in einer Gruppe als bivalent markiert wurden und in der anderen Gruppe als transkriptionell-aktiv durch alle vier aktivierenden Histonmodifikationen detektiert wurden (3.1.5.2).

4 Ergebnis

Die Chondrozytendifferenzierung ist ein essentieller Prozess während der enchondralen Ossifikation. In dieser Arbeit wurde durch die Analyse von Histonmodifikationen der epigenetische Status von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten *in vivo* verglichen, um Unterschiede im Histon-Code während der Chondrozytendifferenzierung zu identifizieren.

4.1 Charakterisierung der transgenen Mauslinien

4.1.1 Spezifische Expression von YFP in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten

Proliferierende Chondrozyten, welche Collagen 2 exprimieren, und hypertrophe Chondrozyten, die Collagen 10 exprimieren, können mit Hilfe von Reportermäusen markiert werden. Dazu wurden *Col2a1-Cre* und *Bac-Col10a1-cre* Mäuse mit *R26R-YFP* Reportermäusen gekreuzt. Die *R26R-YFP* Mäuse besitzen ein von LoxP-sites flankiertes Stoppcodon gefolgt von einer *YFP*-Sequenz im ubiquitär-exprimierten Rosa-Lokus. Die Cre-Rekombinase der transgenen Mäuse wird Chondrozyten-spezifisch unter der Kontrolle des Collagen 2 bzw. des Collagen 10-Promotors exprimiert und rekombiniert die LoxP-sites des Stoppcodons, so dass es zum Verlust der Stoppsequenz und damit zur Expression der folgenden *YFP*-Sequenz kommt. Die Aktivität der Cre-Rekombinase und die damit verbundene *YFP*-Expression wurden im ganzen Embryo und histologisch überprüft. Die *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse zeigten im Stadium E13.5 bis E15.5 eine starke *YFP* Expression in allen Knorpelanlagen (Abb. 9). Im E13.5 Embryo exprimierten die Wirbelsäule, Teile des Schädels und die noch fusionierten Knorpelanlagen der Extremitäten das *YFP*. Im E14.5 Embryo exprimierten auch die Rippen und die Autopoden *YFP*. In den Extremitäten des E14.5 Embryos wurde die hypertrophe Zone durch ein schwächer werdendes Fluoreszenzsignal im Zentrum der proximalen Anlagen sichtbar.

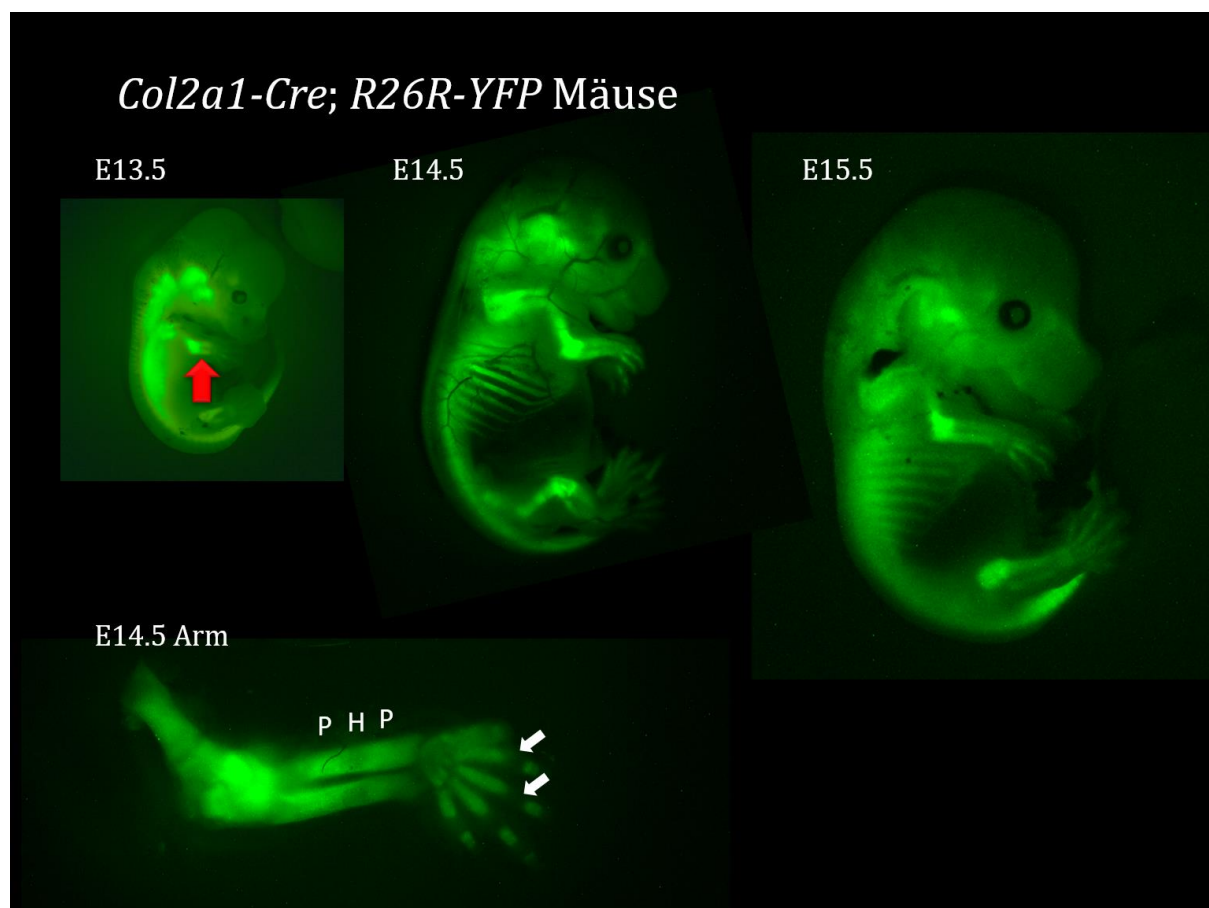


Abb. 9 *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse exprimieren YFP in allen proliferierenden Chondrozyten

Die Embryonen im Stadium E13.5-E15.5 wiesen eine starke YFP-Expression in allen Knorpelanlagen auf. Im E13.5 Embryo sind die Knorpelanlagen der Extremitäten noch fusioniert (Humerus, Ulna und Radius; roter Pfeil). Im E14.5 Embryo exprimieren auch die Rippen und der Fingerelemente YFP. Die Vergrößerung einer freipräparierten E14.5 Vordergliedmaße zeigt einen Teil des Humerus, sowie Ulna und Radius und die Fingeranlagen. In Ulna und Radius zeigt sich die Bildung der hypertrophen Zone (H) durch ein schwächeres Fluoreszenzsignal im Gegensatz zu den proliferierenden Zonen (P). In den Fingerelementen sind noch YFP-freie Zonen erkennbar, in denen sich die Mesenchymzellen (weiße Pfeile) noch nicht zu Chondrozyten differenziert haben. Vergrößerungen: Embryonen 5x, Arm 10x.

Um die Expression des Reportergens auf zellulärer Ebene zu untersuchen wurden Kryoschnitte der Gliedmaßen angefertigt. Die distalen sowie die kolumnaren Chondrozyten wiesen eine starke YFP-Expression in jeder Zelle auf (Abb. 11 a-f; Abb. 12e-l). Da die Cre-Rekombinase auch während der Differenzierung der kolumnaren Zellen in hypertrophe Chondrozyten aktiv bleibt, ist YFP auch in den neu entstandenen, hypertrophen Chondrozyten nachweisbar. Daher wurde die YFP Expression in Mäuse am postnatalen Tag 1 (P1) untersucht. Beim Übergang in die hypertrophe Zone verringerte sich das YFP-Signal und war trotz konstanter Expression nur noch in vereinzelt Zellen

sichtbar (Abb. 11 g-l, Abb. 12 a-d). Da die Zellen im Verlauf der Hypertrophie deutlich an Volumen zunehmen, führt dies wahrscheinlich zur Reduktion des YFP-Signals.

Beim Übergang der hypertrophen Zone in die mineralisierte Zone ließen sich YFP-positive Zellen deutlich von der Autofluoreszenz (rot) im Knochen unterscheiden (Abb. 11k-l). Der Nachweis YFP positiver Zellen im Knochen unterstützt die Hypothese der Transdifferenzierung von hypertrophen Chondrozyten in Osteoblasten (Tsang et al., 2015; Yang et al., 2014; Zhou et al., 2014).

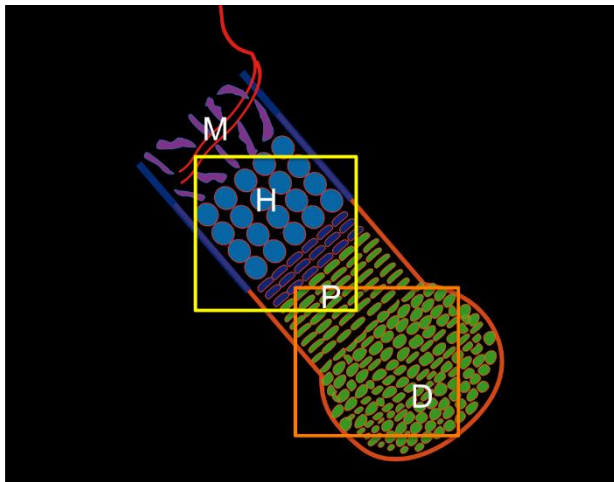


Abb. 10 Schnittmodell durch die verschiedenen Chondrozytenzonen

Für die Analyse der YFP-Expression in distalen (D) und proliferierenden Chondrozyten (P) wurden Schnitte im distalen Bereich der Knorpelanlagen unter Fluoreszenzlicht fotografiert (orangener Rahmen, siehe dazu Abb. 11 a-f). In der gelb umrandeten Abbildung (Abb. 11g-l) lässt sich die Zone der proliferierenden Chondrozyten (P), sowie die hypertrophe (H) und die mineralisierte Zone (M) erkennen.

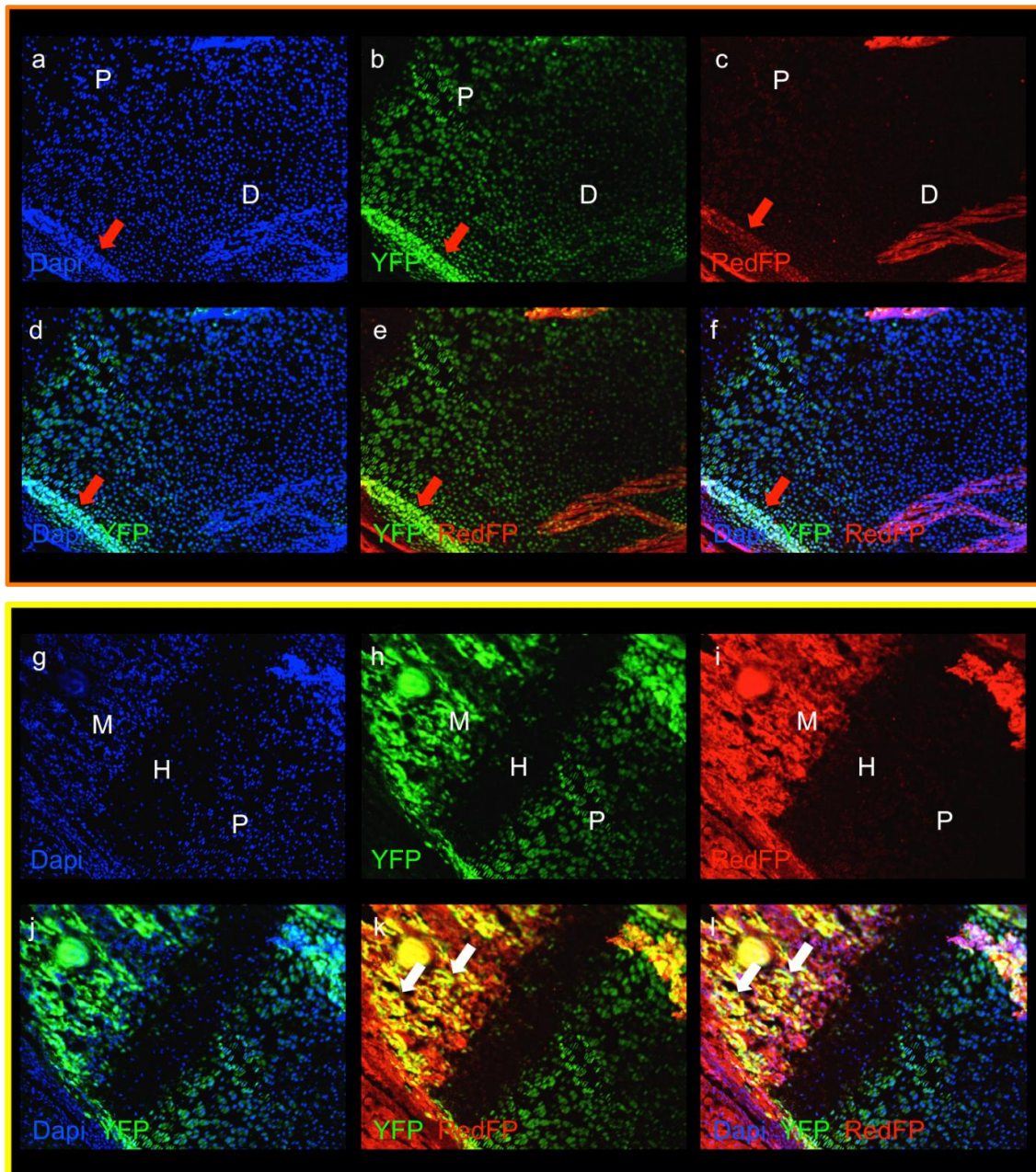


Abb. 11 Die YFP-Expression kann in proliferierenden Chondrozyten, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten von P1 *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäusen detektiert werden

In Kryoschnitten von P1 Mäusen weisen die distalen (D) und kolumnaren Chondrozyten (P) starke YFP-Signale im Humerus der *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse auf (b, d, e, f). Das Periost zeigt Autofluoreszenz in allen Kanälen (rote Pfeile). Das YFP-Signal der proliferierenden Chondrozyten (P) ist stark reduziert in der hypertrophen Zone (H)(h, j, k, l). Die Zellkerne der hypertrophen Chondrozyten sind anhand der Dapi Färbung erkennbar (g, j, l). Die mineralisierte Zone (M) weist eine starke Autofluoreszenz auf (i, k, l). In der mineralisierten Zone sind YFP-positive Zellen zu erkennen, die keine Überlagerung mit dem roten Autofluoreszenzsignal aufweisen (weiße Pfeile). Die Zellkerne sind mit Dapi gefärbt (a, d, f, g, j, l). Das RedFP wurde als Kontrolle der Autofluoreszenz verwendet (c, e, f, i, k, l). Abbildung a-c, g-i zeigen einzelne Farbkanäle (a, g= Dapi; b, h=YFP; c, i=RedFP), die Abbildungen d-f, j-l zeigen Overlays (d, j=DAPI+YFP; e, k=YFP+RedFP; f, l= Dapi+YFP+RedFP) in 100x Vergrößerung.

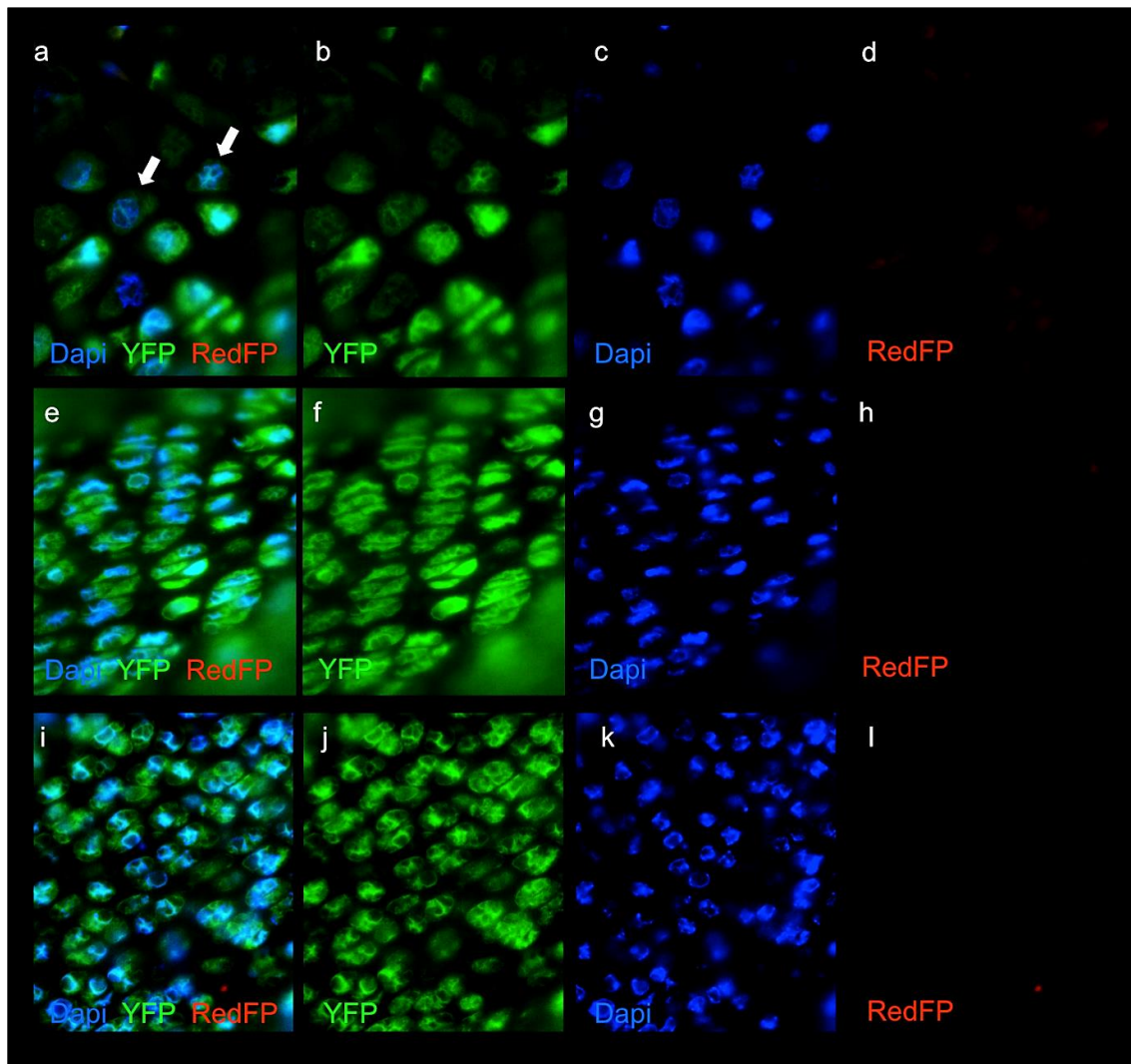


Abb. 12 Hypertrophen Chondrozyten im Stadium P1 wiesen nur ein geringes YFP-Signal in *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäusen auf

Die distalen (i-l) und kolumnaren Chondrozyten (e-h) weisen ein starkes YFP-Signal auf. Beim Übergang von prähypertrophen zu hypertrophen Chondrozyten vergrößern sich die Zellen, wodurch es zu einer Reduktion des YFP-Signals kommt (a-d) (Pfeile). Die Abbildungen a, e, i zeigen die Overlays von Dapi, YFP und RedFP, die anderen Abbildung zeigen die einzelnen Farbkanäle (b, f, j=YFP; c, g, k= Dapi; d, h, l=RedFP) in 630x Vergrößerung.

Insgesamt wiesen die *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse in allen proliferierenden Chondrozyten eine starke Expression von YFP im E13.5 Embryo auf. Diese Expression bleibt in späteren Stadien der Differenzierung, in hypertrophe Chondrozyten und Osteoblasten, erhalten. Zur Isolation reiner proliferierender Chondrozyten wurden daher für die weiterführenden Experimente nur Embryonen des Stadiums E13.5 verwendet, da in diesem Stadium noch keine hypertrophen Zellen entstanden sind.

Zur Analyse der hypertrophen Chondrozyten wurden *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse genutzt. In den *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Mäusen wurde zum Zeitpunkt E14.5 ein schwaches YFP-Signal in der Mitte der Knorpelanlagen sichtbar. Deutliche Signale konnten erst zum Zeitpunkt E15.5 festgestellt werden (Abb. 13). Wie bereits von Yang et al. beschrieben, zeigten die *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Linie eine ektopische Expression in der Haut (Yang et al., 2005). Zur Isolation von Chondrozyten wurde diese vollständig entfernt. Um ein geeignetes Embryonalstadium zur Isolation der hypertrophen Chondrozyten zu finden wurden Kryoschnitte von *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Extremitäten angefertigt. In E14.5 und E15.5 Embryonen konnten keine YFP-Signale detektiert werden, weshalb die Expression des *Bac-Col10a1-Cre* Allels mit Hilfe einer *R26R-LacZ* Reportermaus geprüft wurden. Diese *R26R-LacZ* Reportermause besitzen, anstelle des *YFP*-Gens ein β -Galaktosidase-Gen. Nach Farbumsatz durch die β -Galaktosidase zeigten die E17.5 *Bac-Col10a1-Cre; R26R-LacZ* Embryonen, im Vergleich zum Wildtyp (WT) Geschwistertier (Abb. 14), eine spezifische Färbung in den hypertrophen Chondrozyten. Die Kryoschnitte eines E14.5 *Bac-Col10a1-Cre; R26R-LacZ* Tieres zeigten im Gegensatz zum fehlenden YFP-Signal in den *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Mäusen eine spezifische β -Galaktosidase-Färbung in der hypertrophen Zone (Abb. 14c, f). Die Cre-Rekombinase ist somit in hypertrophen Chondrozyten des E14.5 Embryos aktiv und sollte auch in den *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Tieren aktiv sein. Aufgrund dieser Versuche wurden E14.5 und E15.5 Embryonen zur Isolation von hypertrophen Chondrozyten verwendet die noch keine Transdifferenzierung in Osteoblasten aufweisen.

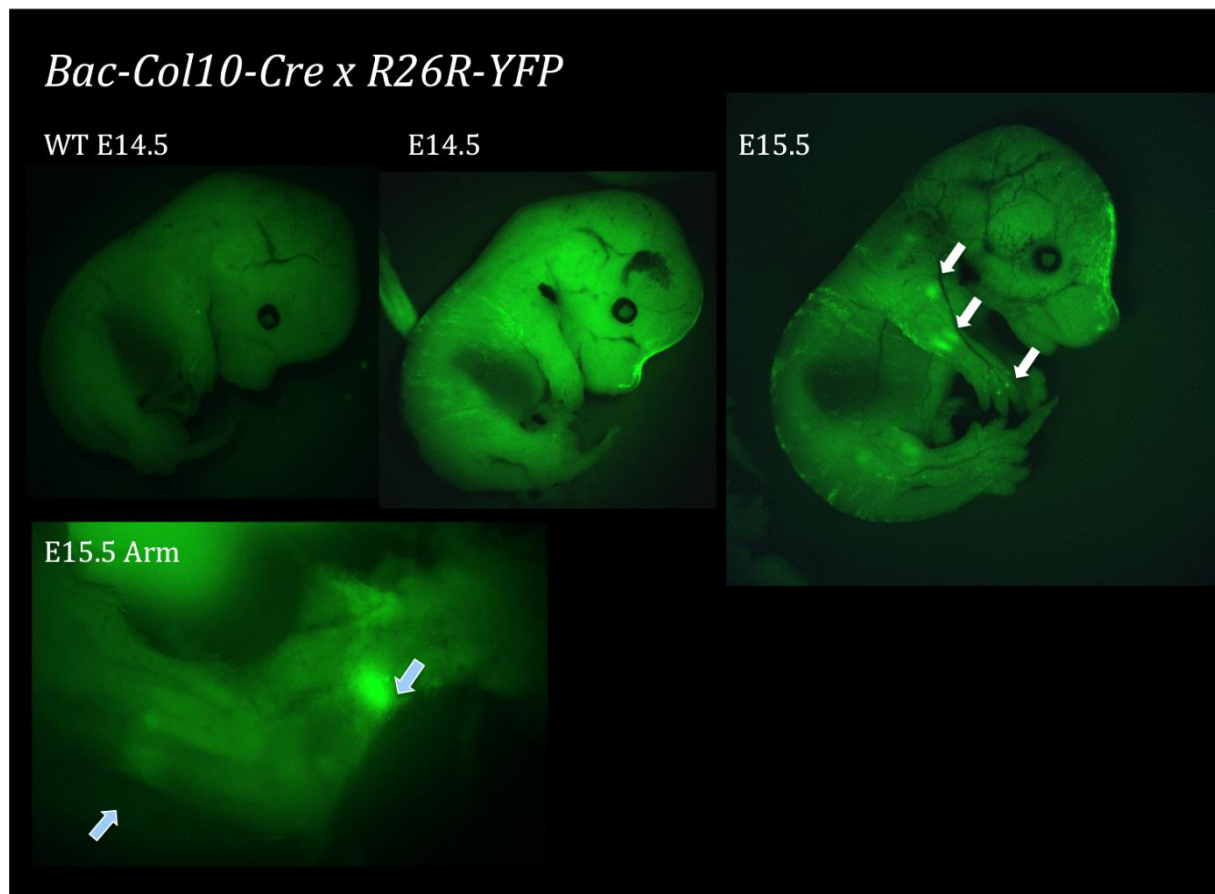


Abb. 13 YFP-Expression in *Col10a1-Cre; R26R-YFP* Mäusen

Im E14.5 Embryo ist die YFP-Expression in hypertrophen Chondrozyten kaum sichtbar. Nur die ektopische Expression von YFP in der Haut lässt Unterschiede zum WT Geschwistertier erkennen. Erst im Stadium E15.5 zeigt sich eine deutlich punktuelle Expression in der Mitte der Knorpelanlagen von Humerus, Radius und Ulna und in den Fingern (weiße Pfeile). In der Vergrößerung des präparierten Vorderbeins eines E15.5 Embryos ist eine distinkte Lokalisation in hypertrophen Chondrozyten erkennbar. Die blauen Pfeile zeigen die Fluoreszenzsignale in Humerus und Ulna. Vergrößerungen: Embryonen 5x, Vorderbein 10x.

Bac-Col10-Cre; R26R-LacZ

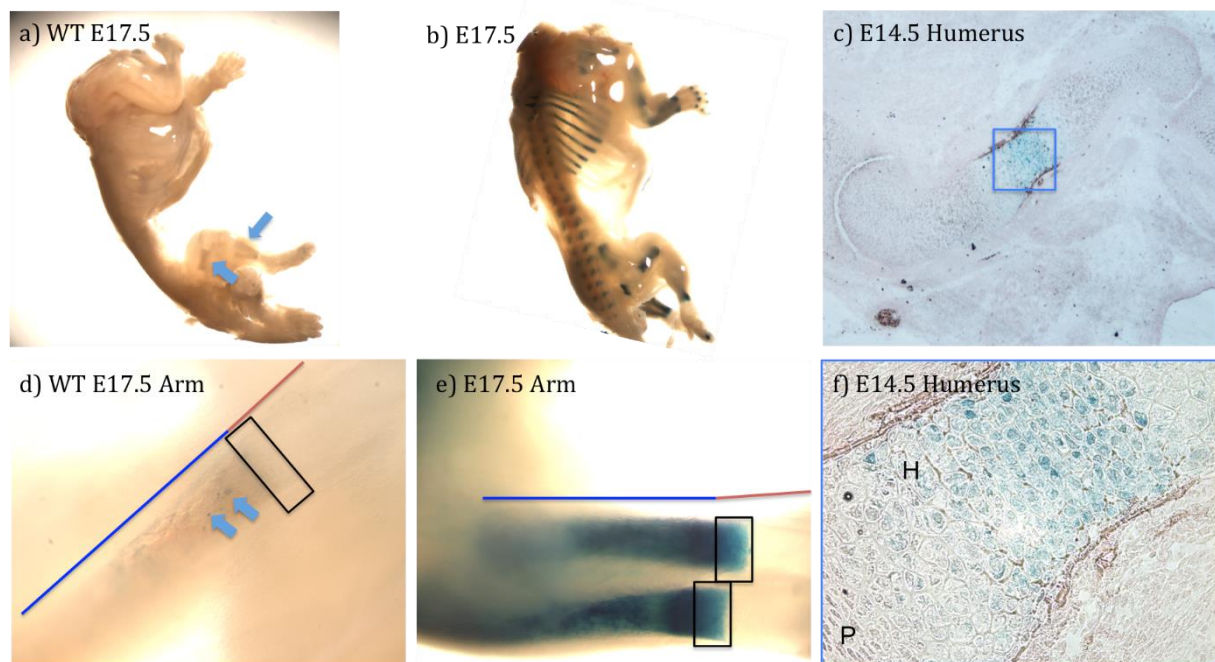


Abb. 14 Nachweis der *Col10a1*-Cre Aktivität in hypertrophen Chondrozyten

WT (a, d) und *Col10a1*-Cre; *R26R-LacZ* (b, c, e, f) Embryonen des Stadiums E17.5 (a, b, d, e) und E14.5 (c, f) wurden zum Nachweis der spezifischen Cre Rekombinase Aktivität in hypertrophen Chondrozyten mittels X-Gal-Färbung angefärbt. Der E17.5 *Col10a1*-Cre; *R26R-LacZ* Embryo weist eine große gefärbte Zone auf, die zentral mineralisierten Knochen enthält (e, blaue Markierung). Nur die Enden der gefärbten Zone enthalten hypertrophe Chondrozyten (schwarze Kästchen). Im WT-Kontrollarm (d) markiert die orangene Linie die Epiphyse mit ungefärbten Chondrozyten. In der mineralisierten Zone (blaue Linie) sind kleine partielle Blaufärbungen zu erkennen, die durch die endogene β -Galaktosidase-Aktivität der Osteoblasten entstehen (blaue Pfeile). Die Kryoschnitte eines E14.5 *Col10a1*-Cre; *R26R-LacZ* Embryos zeigen eine breite hypertrophe Zone im Humerus (c, f). Die Vergrößerung (blaues Kästchen) (f) weist hypertrophe Chondrozyten morphologisch durch ihre Größe und die blaue Färbung des X-Gals Farbsubstrates nach. Als Gegenfärbung wurde Kernechtrot verwendet. P=proliferierende Chondrozyten; H=hypertrophe Chondrozyten Vergrößerung: a, b) 5x; c) 50x, d, e) 10x; f) 100x.

4.1.2 Isolation von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten mittels FACS

Nachdem die Spezifität der YFP-Expression in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten bestätigt wurde, sollten diese Zellen mittels *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) isoliert werden. Die typischen FACS-Protokolle sehen die Sortierung lebender Zellen vor. In Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass dieser Versuchsansatz für die rigiden und sensiblen Chondrozyten nicht geeignet ist, da durch ihre unbewegliche

Zellmembran und ihre Sensitivität gegenüber äußeren Einflüssen der größte Prozentsatz der Chondrozyten durch den Sortierprozess zerstört wurde. Sowohl die Becton Dickinson Aria II Technologie, bei der die Zellen durch einen Stromimpuls abgelenkt werden, als auch die FACS Calibur Technologie, bei der sie durch einen Stoß sortiert werden, zerstörte die Chondrozyten (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde ein neues Protokoll für die Chondrozytenisolation etabliert. Anstatt lebende Zellen zu sortieren wurden die Zellen nach Vereinzelung direkt fixiert, wie es für das ChIP Experiment vorgesehen ist. Diese frühzeitige Fixierung führt nicht nur dazu, dass die Chondrozyten dem Sortierprozess standhielten, sondern verhindert auch potentielle Veränderung der Chromatinstruktur durch den Stress des Sortierprozesses.

Um reine Chondrozyten zu erhalten, wurden die Knorpelanlagen freipräpariert und die Zellen mittels Collagenase- und Trypsinverdau vereinzelt und fixiert um die Histone an die DNA zu koppeln. Die Analyse mittels FACS zeigte, dass die Zellsuspension der E13.5 *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Embryonen im Durchschnitt aus 13-24 % YFP-positiven Zellen bestand, die mittels FACS auf 85-95 % angereichert werden konnten (Abb. 15b, e). Um 1×10^7 Zellen zu erhalten, wurden 16-20 E13.5 Embryonen präpariert.

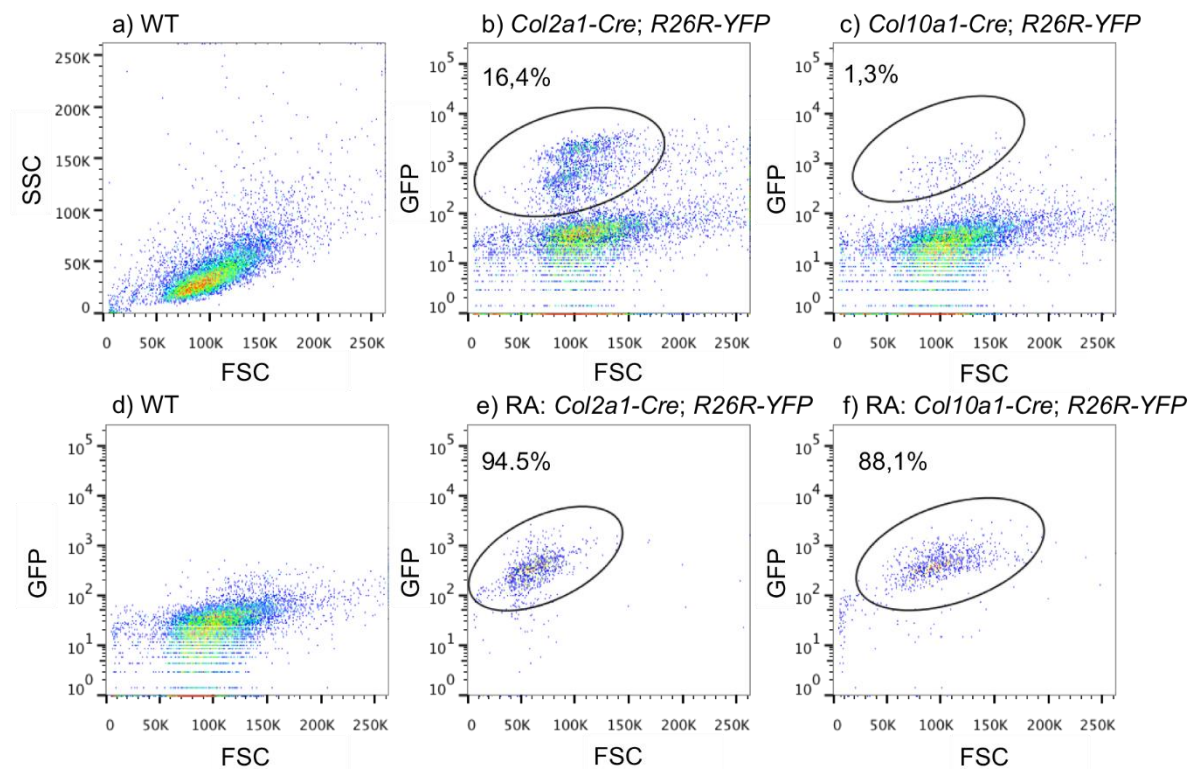


Abb. 15 Anreicherung von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten durch FACS

Das Seitwärtsstreulicht (SSC = Sideward Scatter, Y-Achse) gibt die Granularität der Zellen an, das Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Scatter, X-Achse) die Größe der Zellen (a). Zwischen WT- und YFP-

Mäusen sind in Größe und Granularität der Zellen keine Unterschiede zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Im GFP-Kanal der WT-Zellen (d) ist kein Fluoreszenzsignal sichtbar. In der *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Zellsuspension (b) wurden 16,4 % Zellen und in *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* (c) 1,3 % YFP-positive Zellen detektiert. Nach der Anreicherung durch FACS zeigte die Reanalyse (RA), dass die *Col2a1-Cre; R26R-YFP* Zellen auf 94,5 % und die *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* auf 88,1 % angereichert werden konnten.

Um den optimalen Zeitpunkt mit der höchsten Ausbeute an YFP-positiven Zellen der *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Mäuse zu ermitteln, wurden E14.5 und E15.5 Mäuse analysiert. Zum Zeitpunkt E14.5 wurden durch das schwache YFP-Signal in den *Bac-Col10a1-Cre; R26R-YFP* Tieren selten YFP-positive Zellen detektiert (0,1-0,5 %), so dass nur eine Anreicherung auf 1.000 Zellen pro Embryo möglich war. In E15.5 Embryonen war mit 0,3-1,3 % ein erhöhter Prozentsatz an YFP-positiven Zellen vorhanden. Somit wurden E15.5 Embryonen zur Gewinnung hypertropher Chondrozyten verwendet.

Ebenso wie für die proliferierenden Chondrozyten konnten auch für die hypertrophen Chondrozyten durch das Sortieren eine Anreicherung der YFP-positiven Zellen auf 77-90 % erreicht werden (Abb. 15f).

Typische ChIP-Protokolle verwenden zwischen 1×10^7 und 1×10^8 Zellen pro Antikörper (Ohba et al., 2015; Whyte et al., 2013). Um 1×10^7 hypertrophe Chondrozyten zu erreichen, wären ungefähr 200 Embryonen pro Antikörper benötigt worden. Aus diesem Grund wurde ein ChIP-seq Protokoll etabliert, in dem die Zellzahl auf ein Minimum reduziert wurde. Dazu wurde das Chromatin aus 1×10^7 , $3,5 \times 10^6$, 1×10^6 , $3,5 \times 10^5$ und $1,5 \times 10^5$ proliferierenden Chondrozyten mittels des MicroChIP-Kit von Diagenode immunopräzipitiert, sequenziert und mit dem bereits im Labor etablierten Protokoll für 1×10^7 Zellen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass das MicroChIP-Kit mit $3,5 \times 10^5$ Zellen nahezu identische Read-Zahlen wie das bereits etablierte ChIP-Protokoll für 1×10^7 Zellen aufwies. Mit $1,5 \times 10^5$ Zellen konnten ebenfalls eindeutige Anreicherungen an identischen Genen nachgewiesen werden wie mit $3,5 \times 10^5$ Zellen, jedoch mit einer geringeren *Coverage* des Genoms. Deshalb wurden alle weiteren Experimente mit $3,5 \times 10^5$ Zellen durchgeführt.

Aufgrund dieser Vorversuche wurden die Embryonalstadien E13.5 für proliferierende und E15.5 für hypertrophe Chondrozyten als ideale Stadien zur Isolation YFP-positiver Zellen ausgewählt.

4.2 Analytische Auswertungen der ChIP-seq Daten

4.2.1 Die ChIP-seq Rohdaten zeigen hohe Read-und Alignment-Qualitäten

Zur umfangreichen Analyse des Histon-Codes wurden Modifikationen ausgewählt, die alle wichtigen Aspekte der Genregulation umfassen. Es wurden Antikörper gegen die Transkriptions-aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 genutzt. Zur Detektion der Transkriptions-Initiation wurde H3K4me3 verwendet. H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 dienen zur Transkript-Elongation durch die RNA-Polymerase. H3K27ac ist zudem an Enhancern angereichert. Für die Transkriptions-reprimierenden Histonmodifikationen wurden Antikörper gegen H3K9me3 und H3K27me3 verwendet. H3K9me3 und H3K27me3 dienen zusammen der Repression von Genen und zur Bildung des Heterochromatins. H3K27me3 markiert außerdem, gemeinsam mit der aktivierenden H3K4me3 Markierung, bivalente Gene. Als Positivkontrolle wurde der Input, bestehend aus unpräzipitierter, fragmentierter genomischer DNA, und als Negativkontrolle die Immunopräzipitation durch den IgG Antikörper verwendet. Alle ChIP-seq Experimente sind zur Verifikation der Daten dreimal für proliferierende Chondrozyten und, aufgrund der aufwendigen Zellisolierung, zweimal für hypertrophen Chondrozyten und einmal für ES-Zellen durchgeführt worden. Die ChIP-seq Daten wurden als fastq-files der Illuminaplattform entnommen und enthalten die Information über jedes sequenzierte DNA-Fragment des ChIP-Experiments in Form einer Read-Sequenz von 61 bp.

Diese Reads wurden bezüglich der Basenqualität und Basenfrequenz pro Basenposition, der Basenqualität pro Basenfrequenz und der Basenqualitätsmittelwert der Reads untersucht (Abb. 16). Die Reads aller Modifikationen zeigten eine sehr hohe Basenqualität pro Basenposition und pro Read. Der *Phred score* lag bei allen Untersuchungen im Durchschnitt zwischen 30 und 40. Das weist auf einen sehr niedrigen Fehlerquotienten der Sequenzierung von 1 Base in 1.000-10.000 Basen hin. Aufgrund der verwendeten Sequenzierungstechnologie zeigten die Enden der Reads die höchste Fehlerrate, allerdings lag auch der *Phred Score* der Endbasen bei über 30 und benötigte nicht zwangsläufig ein *Trimming*. Zur Steigerung der Alignment-Qualität wurden trotzdem jeweils die erste und letzte Base pro Read entfernt, sowie bei einzelnen Reads die endständigen Basen, die unter einem *Phred score* von 20 lagen. Die Reads wurden daraufhin gegen das Mausgenom mm10 aligniert, wobei nur ein einmaliges Binden der

Reads im Genom zugelassen wurde. Nach dem Alignment wurden die Reads metrisch auf die Länge der gebundenen Basen kontrolliert und die Duplikate entfernt. Dieses stringente Setting ermöglichte eine sehr hohe Alignment-Qualität.

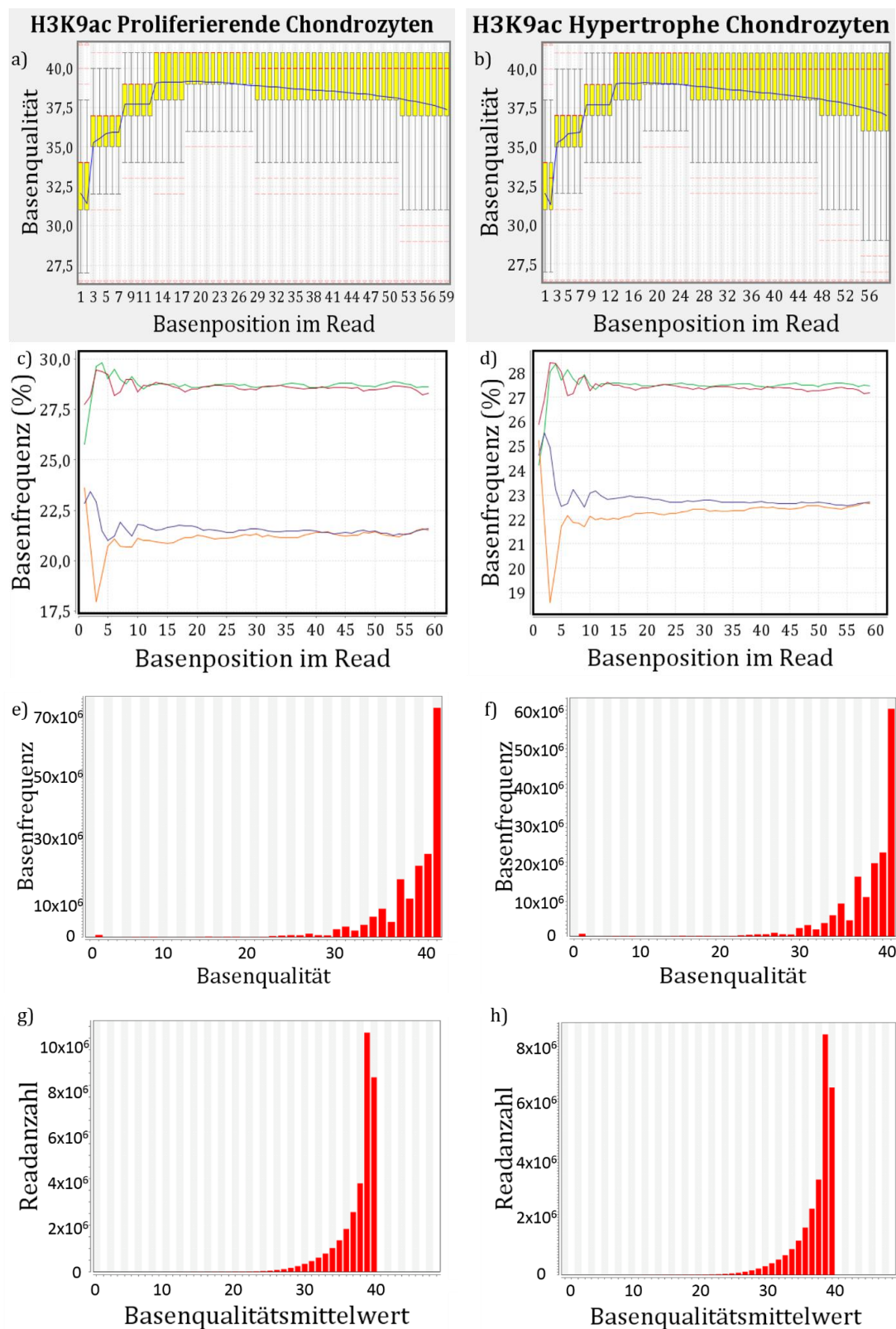


Abb. 16 Prä-Alignmentkontrollen zeigen sehr gute Read-Qualitäten

Die Reads jedes ChIP-Experiments wurden bezüglich der Basenqualität pro Basenposition im Read (a, b), der Basenfrequenz pro Basenposition im Read (c, d), der Basenqualität pro Basenfrequenz (e, f) und der Basenqualitätsmittelwert der Reads (g, h) untersucht. Als repräsentatives Beispiel sind die Reads von H3K9ac in proliferierenden (a, c, e, g) und hypertrophen (b, d, f, h) Chondrozyten dargestellt. Alle Modifikationen zeigen eine sehr hohe Basenqualität pro Basenposition im Read mit einem Mittelwert des *Phred scores* von über 30 (a, b; blaue Linie). Die Basenfrequenz ist pro Basenposition ausbalanciert (c, d) (A=rot, T=grün, C=orange, G=blau). Die Basenqualität pro Base (e, f) liegt bei den meisten Basen bei einem *Phred score* von 40. Ebenso ist der Basenqualitätsmittelwert eines Reads zwischen 30 und 40 (g, h).

Im Durchschnitt wurden für beide Populationen 18-46 Mio. Reads pro ChIP und Input sequenziert (Tab. 1). Die Reads der Transkriptions-aktivierenden Markierungen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, H3K36me3) konnten zu 81-86 % aligniert werden. Von den Reads der Transkriptions-reprimierenden Markierungen (H3K9me3, H3K27me3) konnten mit 71-81 % weniger Reads einer genomischen Sequenz zugeordnet werden. Dies liegt an ihrer Eigenschaft an repetitiven Sequenzen aufzutreten. Dabei war das Alignment der H3K27me3 Reads sowohl in proliferierenden als auch in hypertrophen Chondrozyten um 5-10 % höher als das der H3K9me3 Datensätze. 83 % der Input Reads und 77 % der Kontroll IgG Reads wurden aligniert. Nach der metrischen Verrechnung und dem Entfernen der Duplikate verblieben 54-82 % der Rohdaten für aktivierende-, 56-74 % für reprimierende Markierungen, 46-77 % für den Input und 41-51 % für das IgG. Im Durchschnitt verblieben 10-23 Mio. Reads pro ChIP-Datensatz unter den gewählten, stringenten Bedingungen. Diese wurden für weitere Verrechnungen genutzt.

Proliferierende Chondrozyten

	Rohreads	Unique		Metrisch		Duplikate		Reads
		MW %	STABW	MW %	STABW	MW %	STABW	
Input	31.812.225-39.814.958	82,83	0,49	47,94	0,49	45,75	3,13	16.408.082
H3K4me3	22.052.608-27.112.669	80,63	0,21	67,24	0,21	54,04	20,33	13.540.135
H3K9ac	16.634.665-32.112.091	84,75	6,84	74,25	6,84	64,47	15,65	17.036.228
H3K9me3	18.269.596-32.409.151	71,90	3,19	66,68	3,19	61,72	3,31	16.429.586
H3K27ac	31.188.687-35.996.885	86,40	4,36	74,49	4,36	59,99	37,11	19.945.557
H3K27me3	18.822.038-26.385.691	73,13	0,97	60,29	0,97	55,48	11,96	12.535.398
H3K36me3	20.809.188-45.787.121	85,30	2,21	82,74	2,21	78,46	2,08	23.213.539
IgG	24.548.472-37.531.639	76,90	5,37	69,21	5,37	51,09	11,96	15.223.931

Hypertrophe Chondrozyten

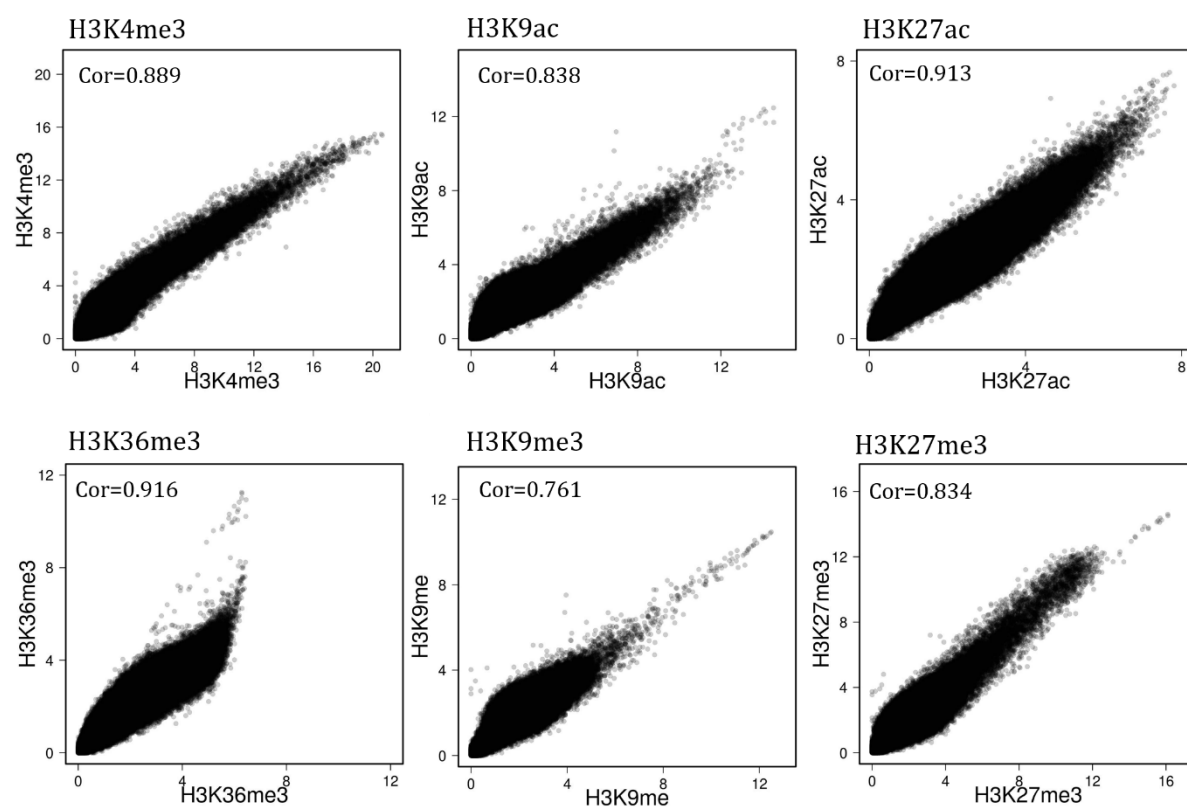
	Rohreads	Unique		Metrisch		Duplikate		Reads
		MW %	STABW	MW %	STABW	MW %	STABW	
Input	21.905.974	83,20		79,92		77,40		16.955.212
H3K4me3	26.383.800-28.272.694	80,43	4,10	77,19	4,77	64,03	11,97	17.368.755
H3K9ac	23.926.194-26.878.543	87,77	2,90	85,37	3,37	68,20	16,35	17.135.704
H3K9me3	32.406.653-38.524.859	70,70	5,37	66,08	5,95	61,73	6,52	21.892.889
H3K27ac	19.567.110-32.628.262	86,27	3,11	83,42	5,01	66,00	23,17	17.883.026
H3K27me3	22.696.172-30.949.380	80,90	9,05	77,57	10,36	73,90	11,22	19.822.710
H3K36me3	19.602.160-25.700.904	87,05	0,07	83,84	1,16	81,77	1,56	18.521.662
IgG	12.453.033-33.809.514	76,78	3,20	72,86	4,26	41,09	18,67	10.344.241

Tab. 1 Rohdaten der ChIP-Sequenzierung von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten

Die Tabellen zeigen die Daten aller Experimente. Die Rohdaten der Illumina Sequenzierung von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten wurden gegen das mm10 Genom aligniert. Dabei wurde nur ein einmaliges Binden (unique) der Reads im Genom zugelassen. Diese Daten wurden metrisch bearbeitet und die Duplikate wurden subtrahiert. Die verbleibenden Reads zur Peak-Detektion sind in der letzten Spalte der Tabelle aufgelistet. Alle Alignment Reports sind der Arbeit auf DVD beigelegt. MW= Mittelwert; STABW= Standardabweichung.

Inwieweit die einzelnen ChIP-seq Replikate untereinander korrelieren und sich die einzelnen Modifikationen untereinander unterscheiden, wurde mit Hilfe des Pearson Korrelation Tests bestimmt. Diese Pearson Korrelation wurde in Kooperation mit Dr. Anja Lange, AG Hoffmann, Universität Duisburg-Essen durchgeführt. Dazu wurde die Anzahl der Reads der jeweiligen Replikate in 5.000 bp *Bins* (Fenstergröße) verglichen. Ein Korrelationskoeffizient (cor) von 1 weist dabei auf zwei lineare, identische Verteilungen hin. Die Replikate jeder Histonmodifikation wurden untereinander korreliert. Dabei zeigten alle Replikate der aktivierenden Histonmarkierungen sowohl in proliferierenden als auch in hypertrophen Chondrozyten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,838 bis 0,923 eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Daten (Abb. 17). Nur die Datensätze der H3K27ac Präzipitation in hypertrophen Chondrozyten zeigte eine geringere Korrelation von 0,639. Die reprimierenden Markierungen zeigten im Durchschnitt ebenfalls einen geringeren Korrelationskoeffizienten von 0,77-0,82, wobei H3K27me3 der hypertrophen Chondrozyten mit 0,356 die niedrigste Korrelation aufwies.

Proliferierende Chondrozyten



Hypertrophe Chondrozyten

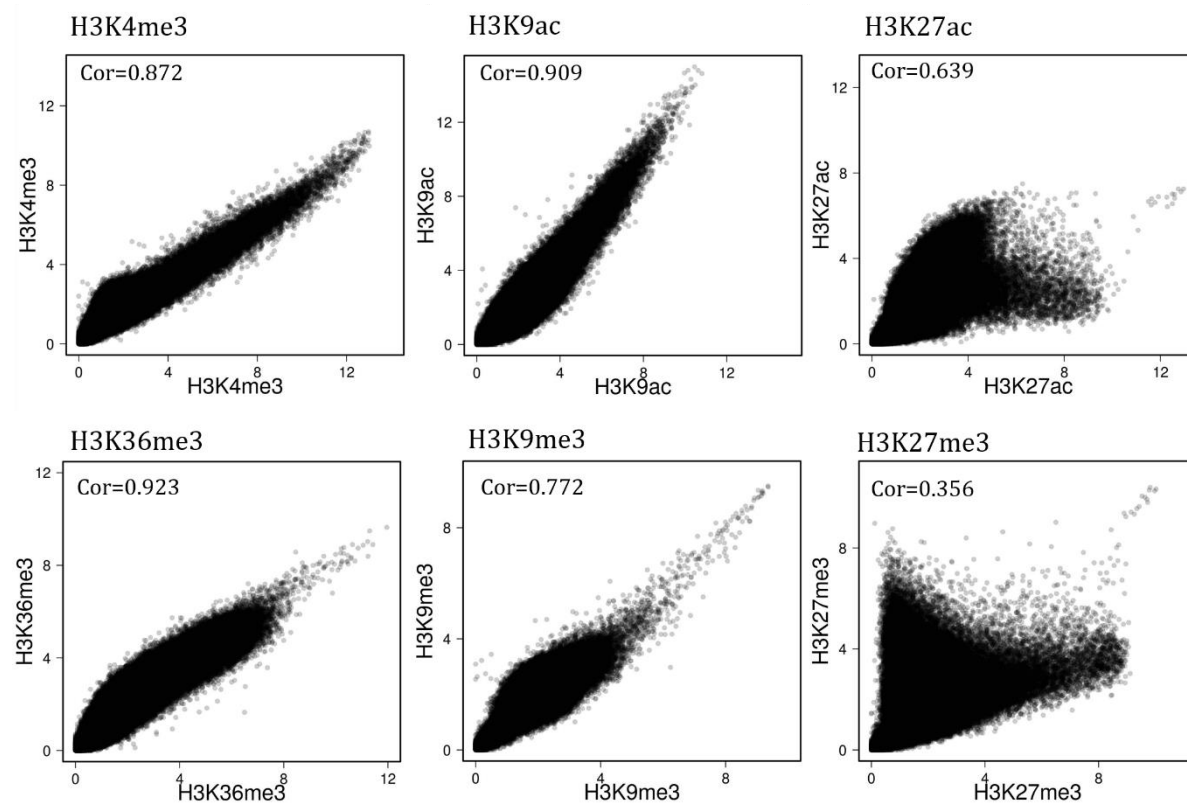


Abb. 17 Die biologischen Replikate der Datensätze wiesen eine hohe Reproduzierbarkeit auf

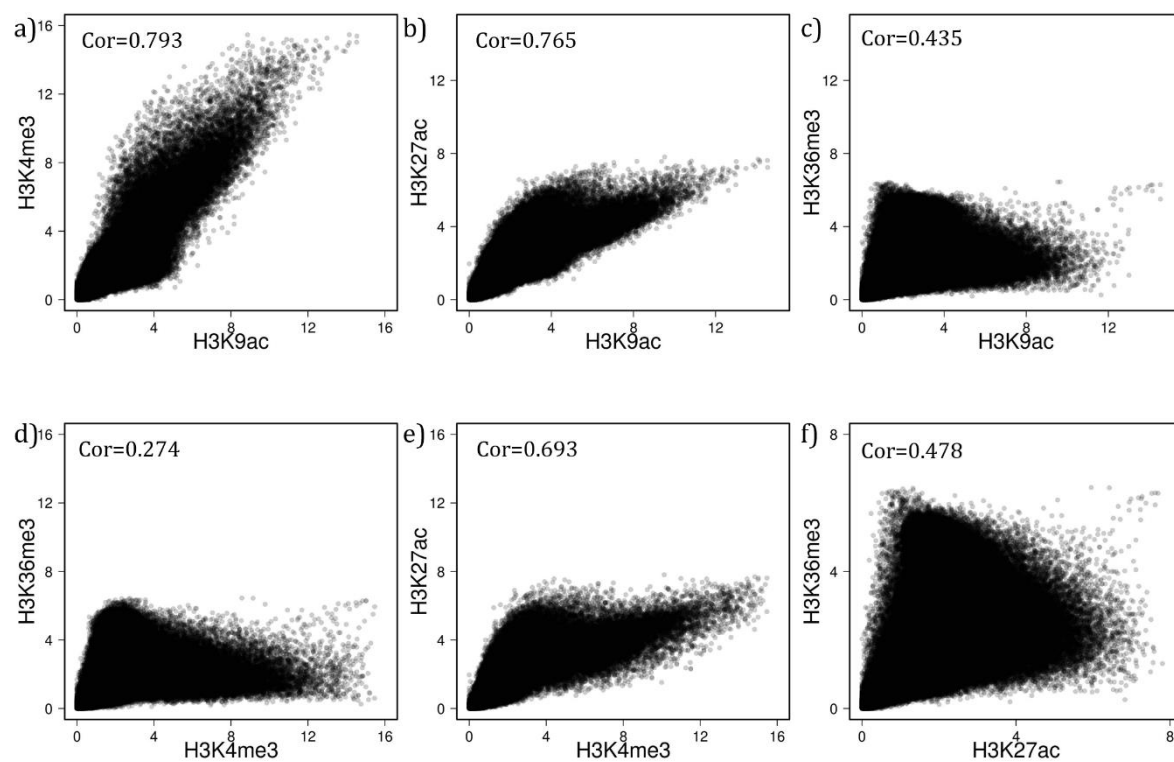
Die Replikate der Experimente von verschiedenen Histonmodifikationen wurden untereinander korreliert und weisen mit Korrelationskoeffizienten (cor) von 0,78-0,92 eine sehr hohe Vergleichbarkeit auf. Jedes Bild zeigt den Vergleich von zwei ChIP-seq Experimenten einer Histonmodifikation. Die Pearson Korrelationen aller Replikate befinden sich auf der beigefügten DVD.

Die Korrelation der Verteilung verschiedener Histonmodifikationen kann ähnliche oder unterschiedliche Lokalisationen der Histonmodifikationen darstellen (Abb. 18). Hierzu wurde jeweils ein Datensatz jeder Histonmodifikation mit einem der anderen verglichen. H3K9ac und H3K4me3 zeigten mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,793, dass ihre Anreicherungen an ähnlichen Genstrukturen, wie z. B. der TSS, zu finden sind. Da H3K27ac nicht nur Promotor- sondern auch Enhancersequenzen markiert, weicht der Korrelationskoeffizient zu H3K9ac und H3K4me3 etwas weiter ab (Abb. 18b,e). H3K36me3 markiert nicht nur die Promotorregion, sondern wird auch am 3'Ende der Gensequenz angereichert (Abb. 5b). Daher korrelieren die Reads der H3K36me3 Markierung weniger mit den anderen, aktivierenden Histonmodifikationen (Abb. 18c, d, f). Beim Vergleich der aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikationen miteinander konnte der gegenseitige Ausschluss zweier Modifikationen, wie es bei H3K9ac und H3K9me3 auftritt, durch den niedrigen Korrelationskoeffizienten bestätigt werden (Abb. 18g). Insgesamt wiesen die Verteilungen der reprimierenden und aktivierenden Histonmodifikationen sehr niedrige Korrelationskoeffizienten auf. Die höchste Korrelation bestand mit 0,287 zwischen H3K4me3 und H3K27me3, da sie simultan an bivalenten Genen auftreten (Abb. 18i). Ähnliche Werte wurden auch für H3K27ac und H3K27me3 (cor=0,209), sowie H3K36me3 und H3K9me3 (cor=0,225) errechnet (Abb. 18m, l).

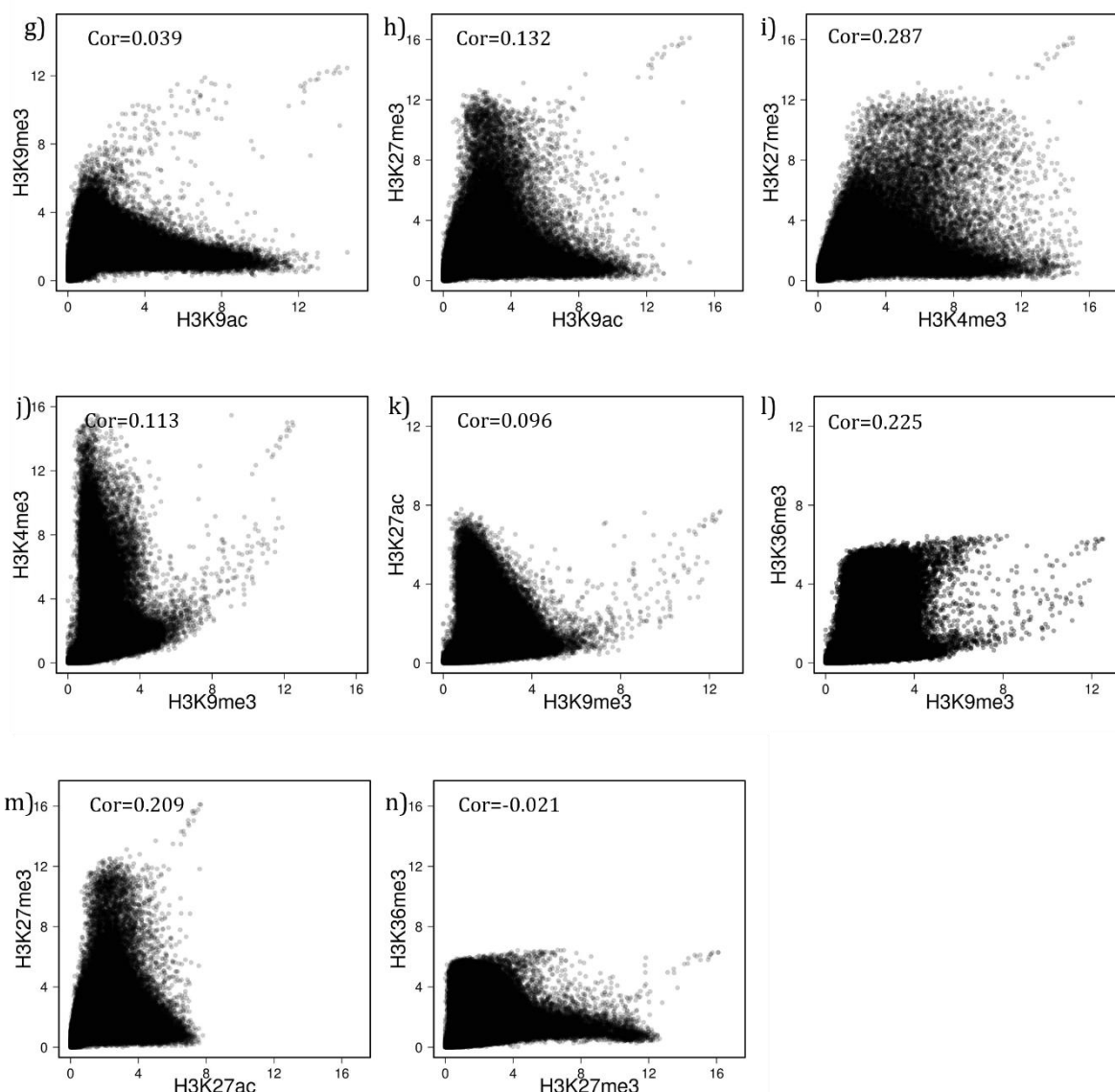
Beim Vergleich der reprimierenden Markierungen wiesen H3K9me3 und H3K27me3 ebenfalls einige Abweichungen auf, da H3K27me3 im Gegensatz zu H3K9me3 zur Repression von bivalenten Genen an den Promotorsequenzen angereichert wird. Die H3K9me3 Markierung verteilt sich hingegen über das Heterochromatin.

Im Allgemeinen konnten die Datensätze mit einer sehr hohen Read-Qualität aligniert werden. Sie zeigten außerdem eine hohe Korrelation der Replikate und die erwarteten niedrigen Korrelationskoeffizienten beim Vergleich der verschiedenen Histonmodifikationen.

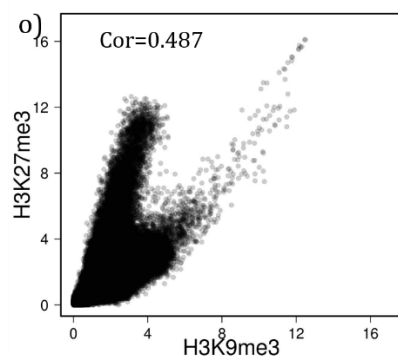
Vergleich aktivierender Histonmodifikationen



Vergleich aktivierender und reprimierender Histonmodifikationen



Vergleich reprimierender Histonmodifikationen

**Abb. 18 Pearson Korrelation der unterschiedlichen Histonmodifikationen**

Der Vergleich der aktivierenden Histonmodifikationen in proliferierenden Chondrozyten (a-f) untereinander zeigt das simultane Auftreten von H3K4me3 und H3K9ac. Der Vergleich von aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikationen (g-n) beweist mit einem niedrigen Korrelationskoeffizienten (cor) den Ausschluss der Modifikationen. Die Korrelation der reprimierenden Histonmodifikationen

H3K9me3 und H3K27me3 weist auf unterschiedliche reprimierende Eigenschaften der Histonmodifikationen hin.

4.2.2 Die Peak-Detektion mit der StrandNGS Software weist mehr Gene durch aktivierende Histonmodifikationen nach

Mit Hilfe von Peak-Algorithmen werden Read-Anreicherungen im Genom erkannt und dem nächstliegenden Gen zugeordnet. Es existieren unterschiedliche Algorithmen zur Bestimmung von schmalen und breiten Peaks, wobei schmale Peaks durch Transkriptionsfaktorbindungen und breite Peaks durch Histonmodifikationen entstehen. Zur Peak-Analyse wurde der von StrandNGS entwickelte „*enriched region detection*“-Algorithmus (ERD) mit unterschiedlichen Parametern für breite-hohe Peaks, wie für H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac (ERD), und für breite-flache Peaks, wie es für H3K9me3, H3K27me3 und H3K36me3 (ERD*) zutrifft, verwendet (Gupta et al., 2015). Für den ERD* wurde die *Windows*-Größe, die *Windows-Slide*-Größe erhöht und die Minimum Anzahl der Reads pro Peak verringert. Der Algorithmus ermittelt Peaks nach Abzug der IgG Reads mit einer 5-fachen Read-Anreicherung gegenüber der Gesamt-Library. Peaks, die bis zu 5.000 bp außerhalb der kodierenden Sequenz liegen, wurden dem nächstliegenden Gen zugeordnet. Innerhalb eines Gens können gleichzeitig mehrere Peaks auftreten.

Im Durchschnitt wurden für die aktivierenden Histonmodifikationen in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten zwischen 15.000 und 25.000 Peaks nachgewiesen, die zur Annotation von 10.000-15.000 Genen führten (Tab. 2).

Im Allgemeinen zeigten die Transkriptions-aktivierenden Histonmarkierungen H3K4me3, H3K9ac und H3K36me3 eine ähnlich hohe Anzahl an Peaks und der dadurch markierten Gene in beiden Chondrozyten-Populationen auf. Die Anzahl von H3K27ac-Peaks und den reprimierenden Markierungen war jedoch in hypertrophen Chondrozyten deutlich erhöht (Tab.2). Für H3K27ac wurden 17 % mehr Peaks in hypertrophen als in proliferierenden Chondrozyten gefunden, was 13 % mehr Genen entspricht. In hypertrophen Chondrozyten wurden durch H3K9me3 doppelt so viele Peaks und die 1,5-fache Anzahl an markierten Genen wie in proliferierenden Chondrozyten nachgewiesen. Für H3K27me3 war die Anzahl der Peaks um das 4-fache erhöht und markierte dreimal so viele Gene wie in proliferierenden Chondrozyten. Somit wiesen die hypertrophen Chondrozyten im Gegensatz zu den proliferierenden Chondrozyten global gesehen eine leicht erhöhte Histonacetylierung, gemessen an H3K27, und eine stark erhöhte

Trimethylierung von H3K9 und H3K27 auf. Dies deutet daraufhin, dass die Regulation durch Reprimierung der Gene mit dem Grad der Differenzierung zunimmt.

Proliferierende Chondrozyten

	ERD	Gene	ERD	Gene	ERD	Gene
H3K4me3	20.353	15.943	22.426	16.563	16.616	14.975
H3K9ac	17.193	12.869	14.948	12.326	14.763	11.929
H3K9me3*	23.737	5.439	28.281	6.962	15.400	5.408
H3K27ac	5.417 ⁺	4.935 ⁺	22.772	13.076	28.088	13.796
H3K27me3*	9.411	3.275	15.653	5030	17.528	5.727
H3K36me3*	294.560	19.552	30.600	8.879	57.909	11.587

Hypertrophe Chondrozyten

	ERD	Gene	ERD	Gene	ERD	Gene
H3K4me3	22.379	16.637	22.913	16.497		
H3K9ac	19.736	14.047	11.810	10.013	16.473	13.167
H3K9me3*	63.795	10.543	28.495	7.258		
H3K27ac	21.207	16.266	36.388	15.028		
H3K27me3*	69.087	11.343	44.410	16.488		
H3K36me3*	86.045	12.987	227.634	18.370		

Tab. 2 Peak-Analyse durch den *Enriched region detection* (ERD)-Algorithmus

Jedes Einzelexperiment von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten wurde mittels ERD analysiert und die Anzahl der Peaks und der dazugehörigen Gene analysiert. Der ERD-Algorithmus wurde mit unterschiedlichen Parameter Settings für breite-hohe Peaks (ERD) und breite-flache Peaks (ERD*) berechnet. Die H3K27ac + Werte der proliferierenden Chondrozyten wurden für die Verrechnungen nicht verwendet. Alle Peak-Listen, inklusive der annotierten Gene sind auf DVD beigefügt.

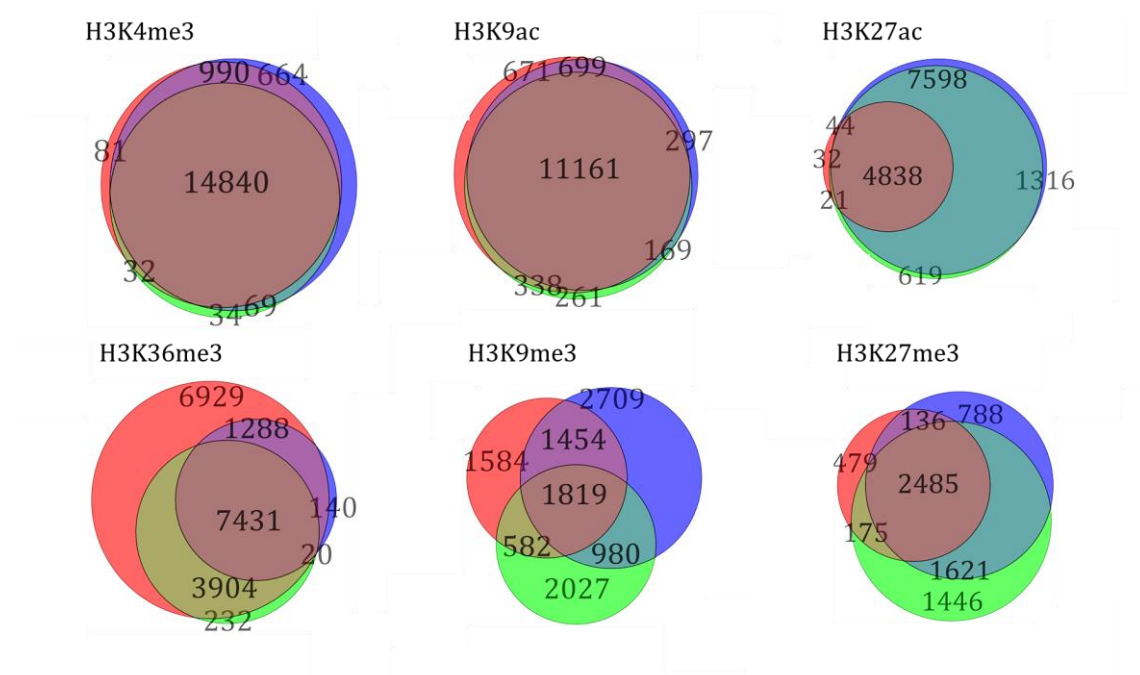
4.2.3 Hohe Übereinstimmung der durch aktivierende Histonmodifikationen markierten Gene

Zusätzlich zur Pearson Korrelation, welche die Einzelexperimente auf Read-Ebene vergleicht, wurden nach der Peak-Detektion durch den ERD-Algorithmus die Einzelexperimente auf Gen-Ebene verglichen.

Insgesamt zeigten die aktivierenden Histonmarkierungen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 in beiden Chondrozyten Populationen eine höhere Übereinstimmung in der Anzahl der markierten Gene als die der reprimierenden Histonmarkierungen (Abb. 19; Tab. 3). Unterschiede zeigte ein Datensatz der H3K27ac Markierung, der nur eine sehr

geringe Abdeckung des Genoms aufwies. Dieser wurde während der Antikörperetablierung mit einem anderen Antikörper (Diagenode) durchgeführt. Mit diesem Antikörper konnte im Gegensatz zu dem Abcam Antikörper nur eine geringe Anzahl an Genen nachgewiesen werden, die jedoch identisch mit den beiden größeren Datensätze von H3K27ac (Abcam) waren (Abb. 19; Tab. 3). Zu weiteren Verrechnungen wurde dieser Datensatz ausgeschlossen.

Proliferierende Chondrozyten



Hypertrophe Chondrozyten

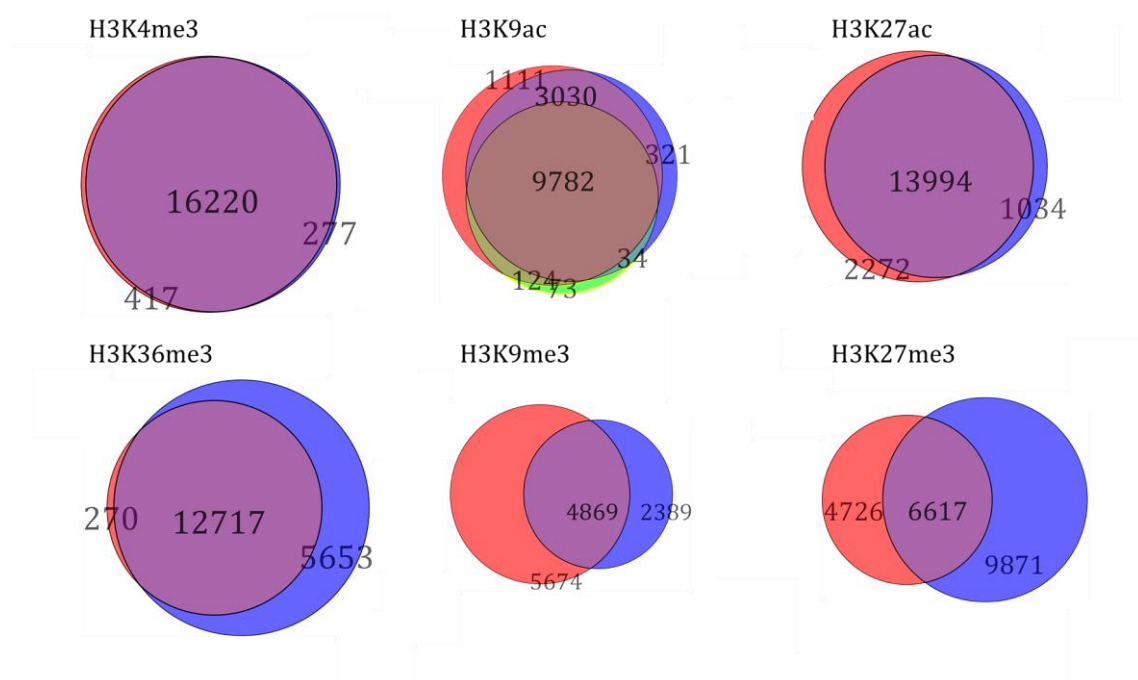


Abb. 19 Vergleich der durch Read-Anreicherung markierten Gene

Die Venn Diagramme zeigen die Übereinstimmung der annotierten Gene aller ChIP-seq Experimente einer Histonmodifikation. Es wurden jeweils drei Experimente für proliferierende- und zwei für hypertrophe Chondrozyten durchgeführt. Für H3K9ac wurden ebenfalls drei Wiederholungen in hypertrophen Chondrozyten angefertigt. Jeder Kreis zeigt die Gene eines Experiments, die Überlappung weist die identischen Gene aller Experimente nach.

Die größten Unterschiede in der Genannotation zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten machten die reprimierenden Histonmodifikationen aus. Dabei konnten nur etwa die Hälfte aller Gene in allen Replikaten gefunden werden. Dies ist ein grundlegendes Problem der reprimierenden Histonmodifikationen, das aufgrund der schlechteren Fragmentierbarkeit des Heterochromatins auftritt (Herlofsen et al., 2013; Mokry et al., 2010).

Proliferierende Chondrozyten

	Alle markierten Gene	Anzahl identischer Gene	%
H3K4me3	16.710	14.840	88,8
H3K9ac	13.596	11.161	82,1
H3K9me3	11.155	1.814	16,3
H3K27ac	14.468	4.838 (n=3); 12.436 (n=2)*	33,4 (n=3); 86 (n=2)*
H3K27me3	7.130	2.485	34,9
H3K36me3	19.944	7.431	37,3

Hypertrophe Chondrozyten

	Alle markierten Gene	Anzahl identischer Gene	%
H3K4me3	16.914	16.220	95,9
H3K9ac	14.475	9.782	67,6
H3K9me3	12.932	4.869	37,7
H3K27ac	17.300	13.994	80,9
H3K27me3	21.214	6.617	31,2
H3K36me3	18.640	12.717	68,2

Tab. 3 Die aktivierenden Histonmarkierungen weisen gegenüber den reprimierenden eine höhere Anzahl an identischen Genen auf

„Alle markierten Gene“ gibt die Gesamtzahl der Gene wieder, welche in allen ChIP-seq Experimenten annotiert wurden. Dabei wurden bei alle Experimenten identische Gene ermittelt, deren Anzahl und Prozentsatz hier aufgelistet sind. H3K27ac* sind die Ergebnisse der Replikate mit dem gleichem Antikörper.

4.2.4 Ein neuer ES Zell-ChIP erweitert die publizierten ES Zell-Daten

Um Änderungen in den Histonmodifikationen während der Differenzierung besser beurteilen zu können, sollten die Daten von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten mit undifferenzierten, embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) verglichen werden. Viele Studien nutzen hierzu den ES-Zell ChIP-seq Datensatz von Mikkelsen et al., 2007. In dieser Studie wurden die Histonmodifikationen von undifferenzierten, murinen ES-Zellen mit differenzierten, neuronalen Progenitorzellen und MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) verglichen (Mikkelsen et al., 2007). Da sich die NGS-Technologien in den letzten 10 Jahren grundlegend verbessert haben und in dieser Arbeit mit deutlich verringerter Zellzahl gearbeitet wurde, wurde ein Histonmodifikations-Profil von murinen ES-Zellen (CCE) generiert und mit den Daten der Mikkelsen Studie verglichen. Während der Mikkelsen ES-Zell-ChIP-seq (M-ChIP) mit 1×10^8 Zellen angefertigt wurde, wurden für den neuen ES-ChIP nur $3,5 \times 10^5$ Zellen verwendet. Die

M-ChIP-Sequenzierungen enthalten Daten der Histontrimethylierungen an H3K4, H3K9, H3K27 und H3K36. Die Reads der M-ChIP Experimente enthalten, im Gegensatz zu den 61 bp Read-Längen des neuen ES-ChIPs, nur Read-Längen zwischen 30-34 bp. Alle Settings zum Alignment wurden der Länge der Reads angepasst. Ansonsten wurden die ES-ChIP-seq Daten unter den gleichen Bedingungen und Settings wie die Daten der proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten analysiert. Während der ES-ChIP nur einmal auf zwei *Flowcell*-Spuren sequenziert worden ist, wurde die M-ChIP-Präzipitation für H3K27me3 siebenmal sequenziert, die H3K4me3 Präzipitation sechsmal, H3K9me3 und H3K36me3 je zweimal. Alle Einzelexperimente wurden für das Alignment gemeinsam verrechnet. Trotzdem lag die Anzahl der Rohreads im Mikkelsen Datensatz mit 18-20 Mio. Reads etwas niedriger als die 18-28 Mio. Reads in dieser Arbeit (Tab. 4). Nach dem Alignment, der metrischen Analyse und dem Entfernen der Duplikate standen beim M-ChIP-seq Datensatz am Ende nur noch 13-33 % der Rohreads (2,5-5,8 Mio.) zur Peak-Detektion zur Verfügung. Beim ES-ChIP-seq Datensatz blieben zwischen 56-84 % der Rohreads (13,7-22,6 Mio.) der einzelnen Histonmodifikationen zur Peak-Detektion erhalten. Für die Peak-Detektion wurden bei dem neuen ES-ChIP Datensatz, ebenso wie bei den Chondrozyten, die Reads der IgG ChIP-Sequenzierung während der Peak-Detektion von den Reads der Histonmodifikationen abgezogen. Beim M-ChIP Datensatz wurden aufgrund der fehlenden IgG ChIP-seq Daten keine weiteren Reads abgezogen.

ES-ChIP	Rohreads	Unique	Metrisch	Duplikate	Reads	ERD	Gene
		%	%	%			
Input	24.234.752	82,40	79,32	77,07	18.676.986		
H3K4me3	26.876.013	87,60	85,84	77,47	20.821.658	42.646	18.337
H3K9ac	27.673.956	88,80	87,09	80,52	22.283.900	45.949	17.180
H3K9me3*	26.750.062	65,80	61,28	56,42	15.093.030	33.083	8.736
H3K27ac	27.091.770	88,70	86,71	83,62	22.653.064	58.486	16.292
H3K27me3*	18.065.789	81,50	78,83	76,29	13.782.521	10.898	7.710
H3K36me3*	20.235.283	81,70	78,89	76,48	15.476.842	23.511	13.273
IgG	18.071.001	79,80	76,81	63,97	11.559.224		

M-ChIP	Rohreads	Unique	Metrisch	Duplikate	Reads	ERD	Gene
		%	%	%			
H3K4me3	18.849.854	51,40	14,60	13,06	2.462.512	13.642	13.490
H3K9me3*	19.105.881	35,80	13,99	12,92	2.469.371	640	247
H3K27me3*	17.517.643	51,70	36,62	32,91	5.764.580	15.265	6.417
H3K36me3*	19.815.298	47,10	21,89	21,39	4.239.015	19.106	5.635

Tab. 4 Der ES-ChIP zeigt gute Alignment-Ergebnisse im Vergleich zu dem Mikkelsen-ChIP

Die Rohreads wurden gegen das Mausgenom mm10 aligniert, wobei nur ein einmaliges Binden (unique) ermöglicht wurde. Die Reads wurden entsprechend ihrer Qualität getrimmt (metrisch) und die Duplikate entfernt. Der ERD-Algorithmus zeigt die Anzahl der detektierten Peaks und die damit markierten Gene. Der ERD-Algorithmus wurde mit unterschiedlichen Parametern für breite-hohe Peaks (ERD) und breite-flache Peaks (ERD*) berechnet. Die Alignment Reports sowie die Peak-Listen mit annotierten Genen befinden auf der beiliegenden DVD.

Im Allgemeinen wurde im M-ChIP Datensatz im Vergleich zum ES-ChIP Datensatz eine geringere Anzahl an Peaks und damit an markierten Genen detektiert. Im ES-ChIP Datensatz wurde für H3K27ac die höchste und für H3K27me3 die niedrigste Anzahl an Peaks nachgewiesen, während bei dem M-ChIP Datensatz für H3K36me3 die höchste und für H3K9me3 die niedrigste Anzahl an Peaks ermittelt wurde (Tab. 4). Die durch H3K4me3, H3K9me3 und H3K36me3 markierten Gene der M-ChIP Experimente waren bis zu 99 % übereinstimmend mit den ES-ChIP Experimenten, wobei im letzteren zusätzlich eine große Anzahl weiterer Gene identifiziert wurde. Zudem wurde der vorhandene Datensatz durch die Analyse der Histonmodifikationen H3K9ac und H3K27ac erweitert. Einzig für die H3K27me3 Modifikation wurden in der Mikkelsen Studie mehr Peaks ermittelt als im ES-ChIP Experiment. Diese konnten jedoch weniger Genen zugeordnet werden.

Insgesamt konnte trotz der niedrigen Zellzahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen eine höhere Anzahl an Peaks und Genen ermittelt werden. Die im M-ChIP identifizierten Gene waren im ES-ChIP Datensatz enthalten, zusätzlich konnten viele weitere Gene nachgewiesen werden. Somit kann die neue ES-ChIP-Sequenzierung als repräsentativ und als Erweiterung der Mikkelsen Daten angesehen werden. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Analysen nur die Daten des neuen ES-ChIP Datensatzes verwendet.

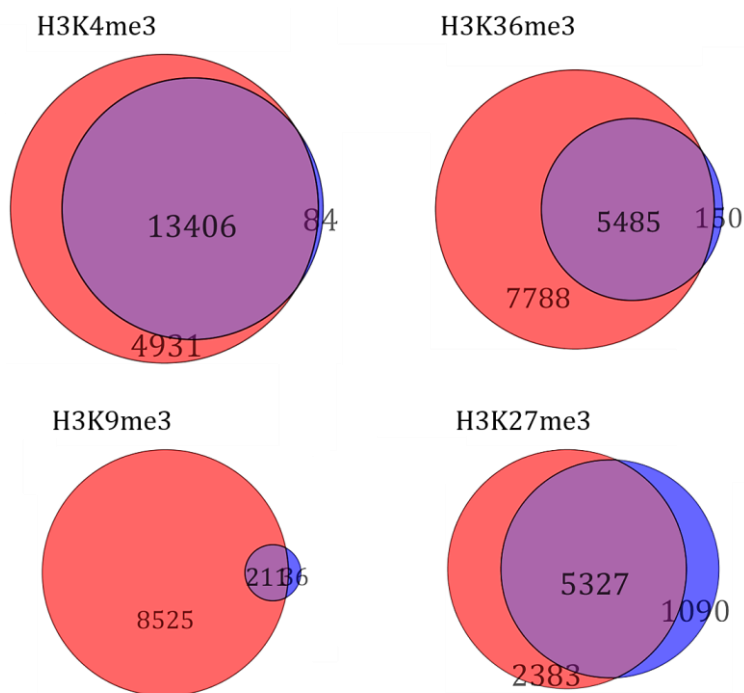


Abb. 20 Hohe Übereinstimmung der markierten Gene beim Vergleich der ES-Zell Datensätze

Der ES-ChIP Datensatz (rot) weist im Vergleich zu dem publizierten M-ChIP Datensatz (blau) deutlich mehr Gene mit den Histonmodifikationen H3K4me3, H3K36me3, H3K9me3 und H3K27me3 auf. Die Übereinstimmungen der gemeinsam identifizierten Gene (Überlappung=violett) waren für H3K4me3, H3K36me3 und H3K9me3 sehr hoch. Mit H3K27me3 wurde in beiden Datensätzen eine hohe Anzahl unterschiedlicher Gene detektiert.

4.3 Biologische Auswertung der ChIP-seq Daten

4.3.1 Chondrozyten-spezifische Gene zeigen aktivierende Peaks, welche in ES-Zellen reprimiert sind

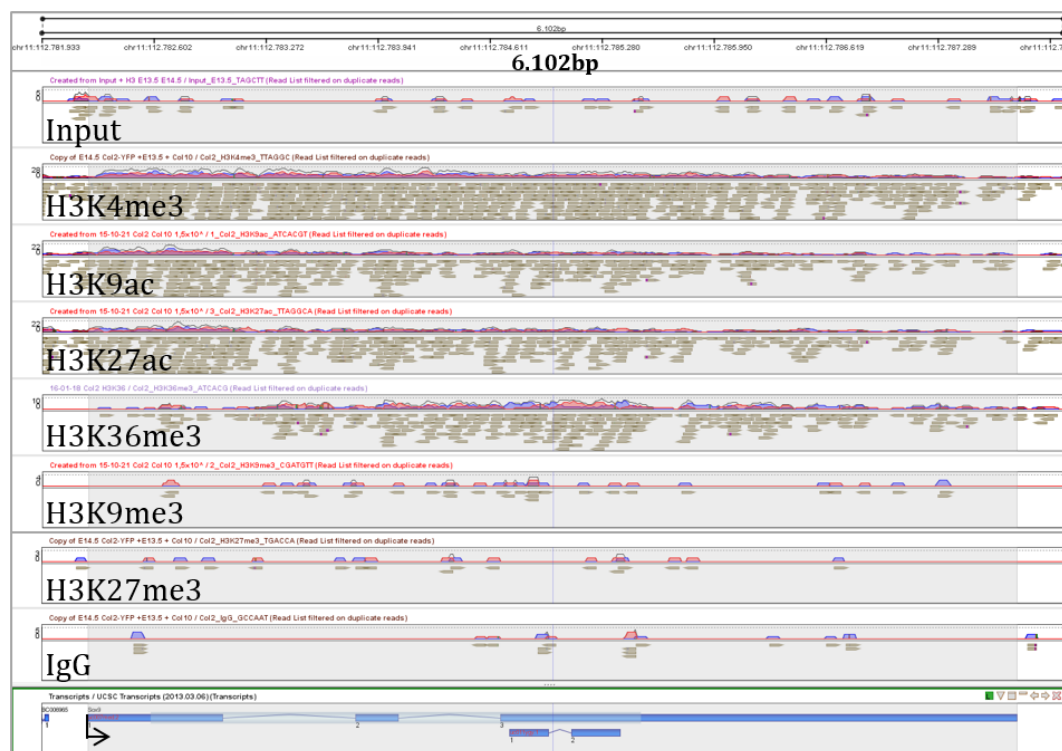
Zur Evaluation der Histonmodifikations-Änderungen während der Chondrozyten-differenzierung wurden die genomischen Sequenzen der Chondrozyten-spezifischen Markergene *Sox9*, *Col2a1* und *Col10a1* in allen drei Zellpopulationen analysiert. Die Expression von *Sox9* beginnt während der mesenchymalen Kondensation der Knorpelanlagen und bleibt in proliferierenden Chondrozyten erhalten. Charakteristisch für proliferierende Chondrozyten ist die Produktion von Collagen 2, während die Produktion von Collagen 10 spezifisch für hypertrophe Chondrozyten ist.

Das *Sox9*-Gen zeigte in proliferierenden Chondrozyten die stärkste Anreicherung der aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac an der TSS im Gegensatz zu den anderen Histonmodifikationen (Abb. 21). Wie erwartet war der RNA-Pol II Transkript Elongationsmarker H3K36me3 stark über die kodierende Region angereichert. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden reprimierenden Histonmodifikationen H3K9me3 und H3K27me3 keine Anreicherungen am *Sox9*-Gen. Damit wies *Sox9* in proliferierenden Chondrozyten das erwartete Histonmodifikations-Muster für transkriptionell-aktive Gene auf.

In hypertrophen Chondrozyten wurden nur Anreicherungen für die zwei aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3 und H3K9ac) ebenso wie für eine reprimierende H3K27me3 Markierung gefunden. Diese Modifikationen charakterisieren *Sox9* als bivalent markiertes Gen ohne transkriptionelle Aktivität (Abb. 21). Interessanterweise ähnelten die Histonmodifikationen in ES-Zellen denen in hypertrophen Chondrozyten mit der bivalenten H3K4me3 und H3K27me3 Markierung, ohne transkriptionelle Aktivität (Abb. 21). Da ES-Zellen in verschiedene Zelltypen differenzieren können und *Sox9* für die Differenzierung verschiedener Gewebe, wie z. B. Nerven-, Hoden-, Haut- und Haarzellen notwendig ist (Adam et al., 2015; Hanley et al., 2000; Scott et al., 2010), dient die bivalente Markierung dazu *Sox9* für die Expression im Verlauf der Differenzierung zu *primen*. In proliferierenden Chondrozyten wird die *Sox9* Transkription aufgrund der aktivierenden Histonmodifikations-Marker hochreguliert und anschließend in hypertrophen Chondrozyten durch H3K27me3 reprimiert, um die Transkription zu terminieren.

Proliferierende Chondrozyten

Sox9 chr11:112781933-112788034



Hypertrophe Chondrozyten

Sox9 chr11:112781933-112788034



ES

Sox9 chr11:112781933-112788034

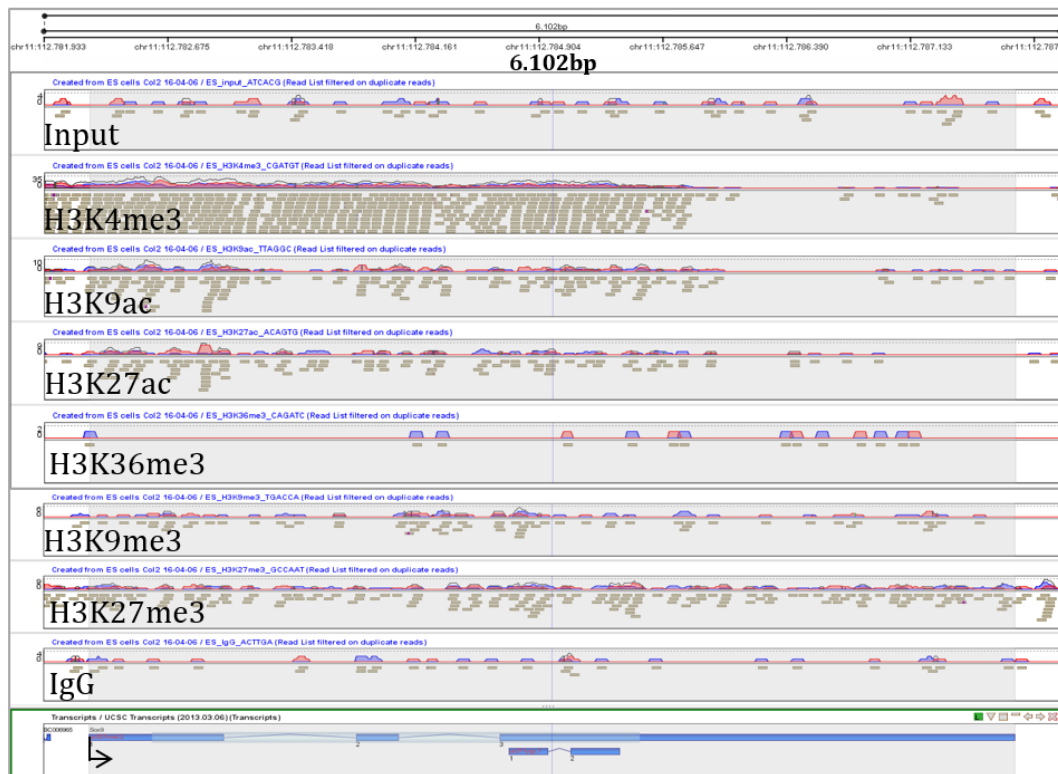


Abb. 21 Das Sox9 Gen weist in proliferierenden Chondrozyten das typische Histonmodifikations-Muster für transkriptionell-aktive Gene auf

Die Histonmodifikationen des Sox9-Gen in proliferierenden Chondrozyten weisen, durch die Anreicherung von H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 auf transkriptionelle Aktivität hin. Zudem liegt keine Repression durch H3K9me3 oder H3K27me3 vor. In hypertrophen Chondrozyten und ES-Zellen weist das Sox9-Gen die bivalente Markierung durch die Anreicherung von H3K4me3 und H3K27me3 auf. Der Bildausschnitt zeigt die Sox9-Sequenz von 6.102 bp auf Chromosom 11 (chr11:112.781.933-112.788.034). Die zwei möglichen Transkripte des Sox9-Gens beginnend an der TSS (Pfeil) mit drei (oben) bzw. zwei (unten) Exons (blaue Kästchen) und der Intronsequenz (blaue Linien) wurden mit UCSC annotiert.

Die Untersuchungen der Histonmodifikationen für das Col2a1-Gen ergab unspezifische Bindungen aller Antikörper, sowie Anreicherungen des Inputs an der Promotorregion in proliferierenden Chondrozyten (Abb. 22). Die Anreicherung der Reads zeigte sich in zwei Blöcken, die durch die Nukleosomen-freie Zone an der TSS unterteilt wurden. Diese Anreicherung konnte nicht in hypertrophen Chondrozyten oder in ES-Zellen beobachtet werden. Sie scheint typisch für proliferierende Chondrozyten zu sein und kann auf eine Änderung der Chromatin-Organisation aufgrund der hohen transkriptionellen Aktivität hinweisen. Neben den zwei Readblöcken zeigte sich die Aktivität von Col2a1 durch die Anreicherungen und die hohe Dichte der Reads von H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und

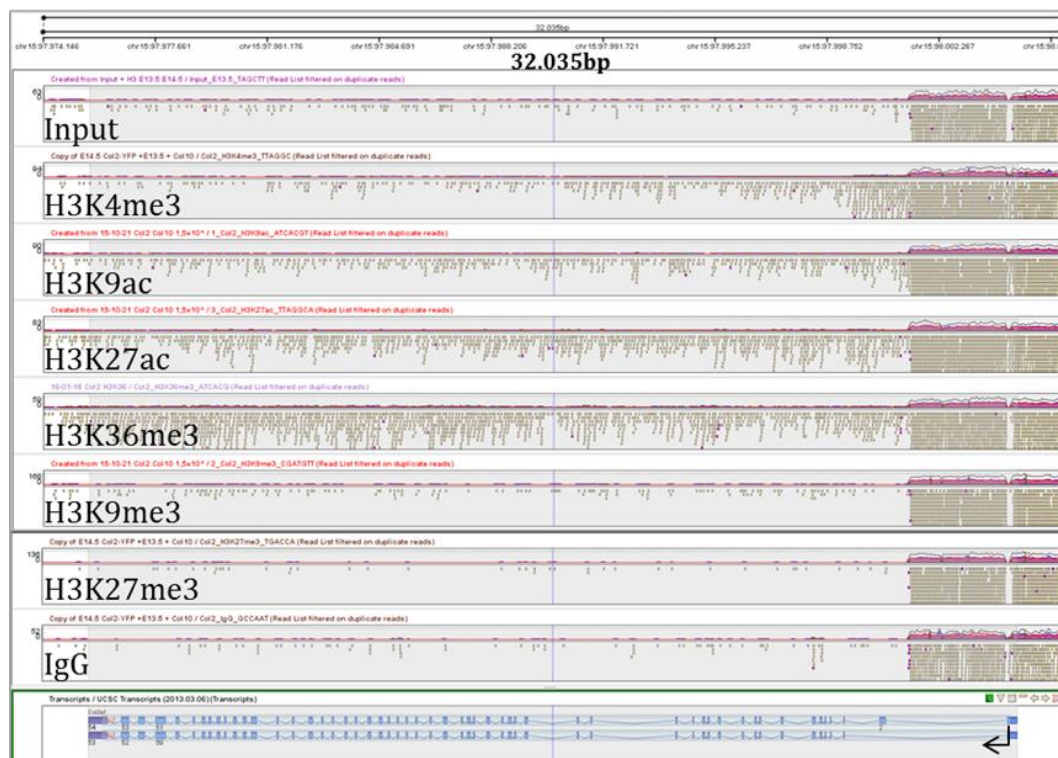
H3K36me3. Wie erwartet wies H3K4me3 die meisten Reads nahe der TSS (Nahe der Readblöcke) auf. Die H3K9ac- und H3K27ac-Anreicherungen zogen sich zusätzlich zum TSS-Peak über die gesamte Gensequenz. Eine Anreicherung von H3K36me3 als Zeichen für die aktive Transkription war deutlich über die kodierende Sequenz sichtbar. Die reprimierenden Markierungen H3K9me3 und H3K27me3 wiesen, ähnlich wie die IgG-Kontrolle und der Input, neben den unspezifischen Readblöcken keine Anreicherungen in den genomischen Regionen auf.

In hypertrophen Chondrozyten waren am *Col2a1*-Gen die reprimierende Histonmodifikationen H3K27me3 angereichert und die Read-Dichte der aktivierenden Histonmodifikationen im Vergleich zu den proliferierenden Chondrozyten deutlich reduziert (Abb. 22). Während mit den Antikörpern gegen H3K4me3, H3K27ac und H3K36me3 flache Peaks detektiert wurden, wurde kein Peak für H3K9ac gefunden.

In ES-Zellen fanden sich um die TSS des *Col2a1*-Gens Anreicherungen der H3K4me3-, H3K9ac- und H3K27ac- Markierungen, jedoch nicht für H3K36me3. Zusätzlich wurden wie in hypertrophen Chondrozyten die reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 am *Col2a1*-Gen gefunden (Abb. 22). Neben den Peaks an der TSS konnten Peaks downstream der TSS-Sequenz für H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac nachgewiesen werden. Möglicherweise könnte es sich um ein regulierendes Element in der Intronsequenz des *Col2a1*-Gens handeln, welches in Chondrozyten nicht aktiv ist.

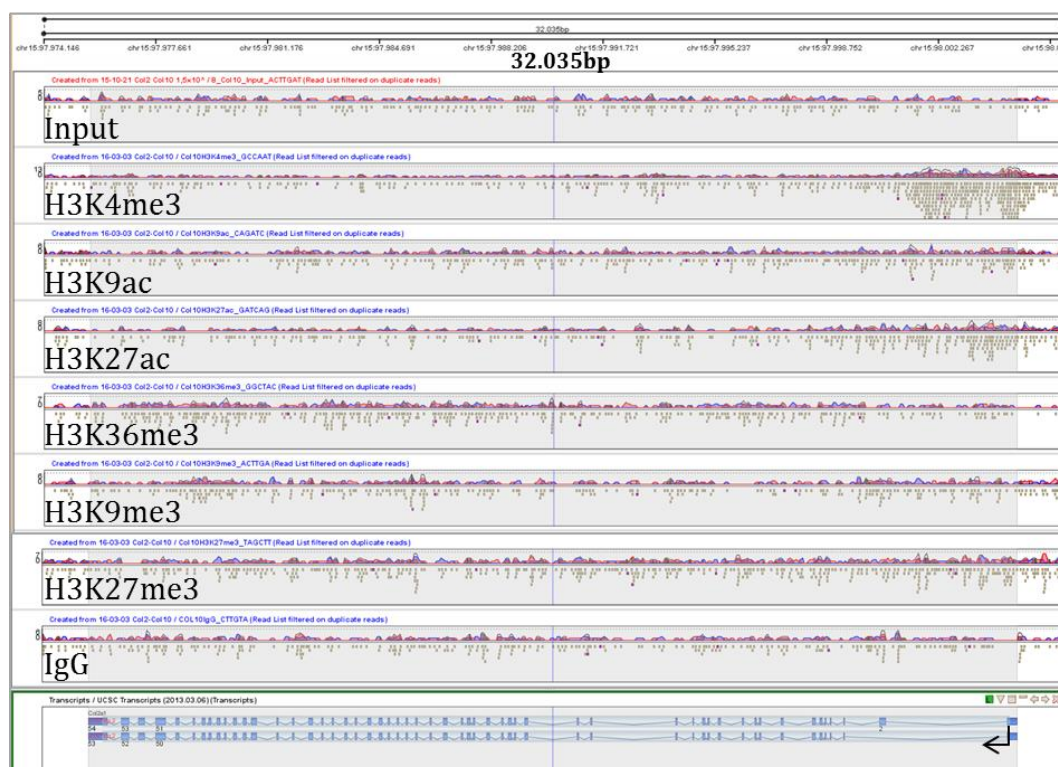
Proliferierende Chondrozyten

Col2a1 chr15: 97974146-98006180



Hypertrophe Chondrozyten

Col2a1 chr15: 97974146-98006180



ES

Col2a1 chr15: 97974146-98006180

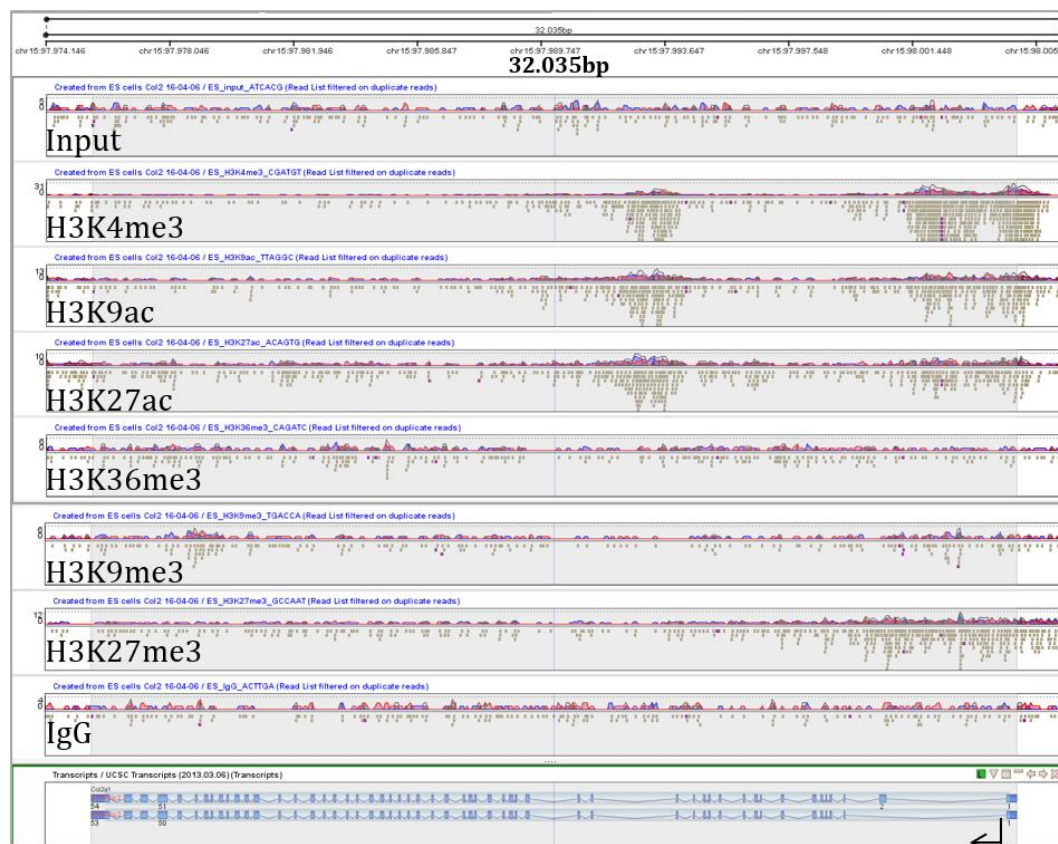


Abb. 22 Die Histonmodifikationen des *Col2a1*-Gen reflektiert die spezifische Expression in proliferierenden Chondrozyten

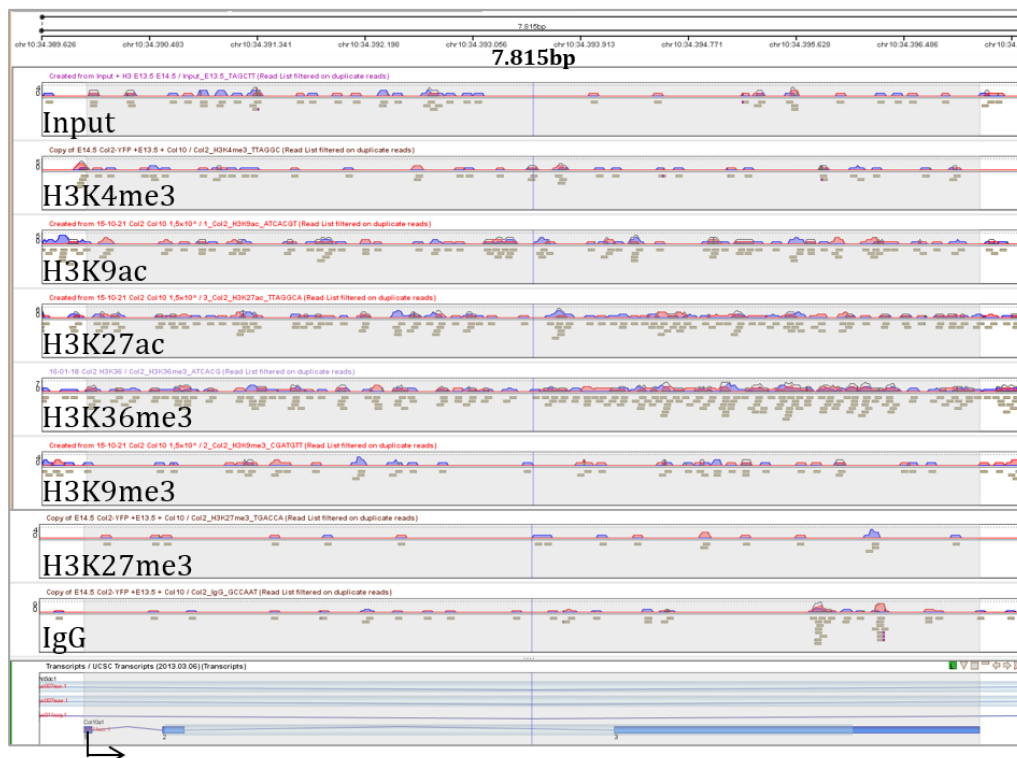
Die Histonmodifikationen des *Col2a1*-Gens zeigen starke Unterschiede in proliferierenden Chondrozyten, hypertrophen Chondrozyten und ES-Zellen. Durch alle Antikörper wird eine Read-Anreicherung an der TSS (Pfeil) und der Promotorregion von proliferierenden Chondrozyten im Gegensatz zu den hypertrophen Chondrozyten und den ES-Zellen angezeigt. Die gesamte *Col2a1*-Sequenz des Chromosoms 15 (chr15: 97.974.146-98.006.180) mit einen Bildausschnitt von 32.035 bp ist dargestellt. Die zwei möglichen Transkripte des *Col2a1*-Gens mit 54 (oben) bzw. 53 (unten) Exons (blaue Kästchen) und der Intronsequenz (blaue Linien) wurden mit UCSC annotiert.

Das *Col10a1*-Gen, als Marker für hypertrophe Chondrozyten, zeigte erwartungsgemäß in proliferierenden Chondrozyten keine Anreicherungen der Histonmodifikationen an der TSS (Abb. 23). Die leichte Anreicherung von H3K36me3 beruht möglicherweise auf der Expression eines anderen Gens, *Nt5dc1* (5'-nucleotidase domain containing 1), das die kodierende Sequenz von *Col10a1* überspannt. In hypertrophen Chondrozyten zeigte sich am *Col10a1*-Gen eine unerwartete Anreicherung sowohl aktivierender als auch reprimierender Markierungen im Input und im IgG. Diese starken unspezifischen Anreicherungen, die auch in proliferierenden Chondrozyten am *Col2a1*-Gen auftraten,

könnten mit der hohen transkriptionellen Aktivität dieser Gene einhergehen und auf eine veränderte Chromatinstruktur hindeuten. In ES-Zellen ähnelt das Histonmodifikations-Muster dem der proliferierenden Chondrozyten, da keine Anreicherungen detektiert wurden (Abb. 23).

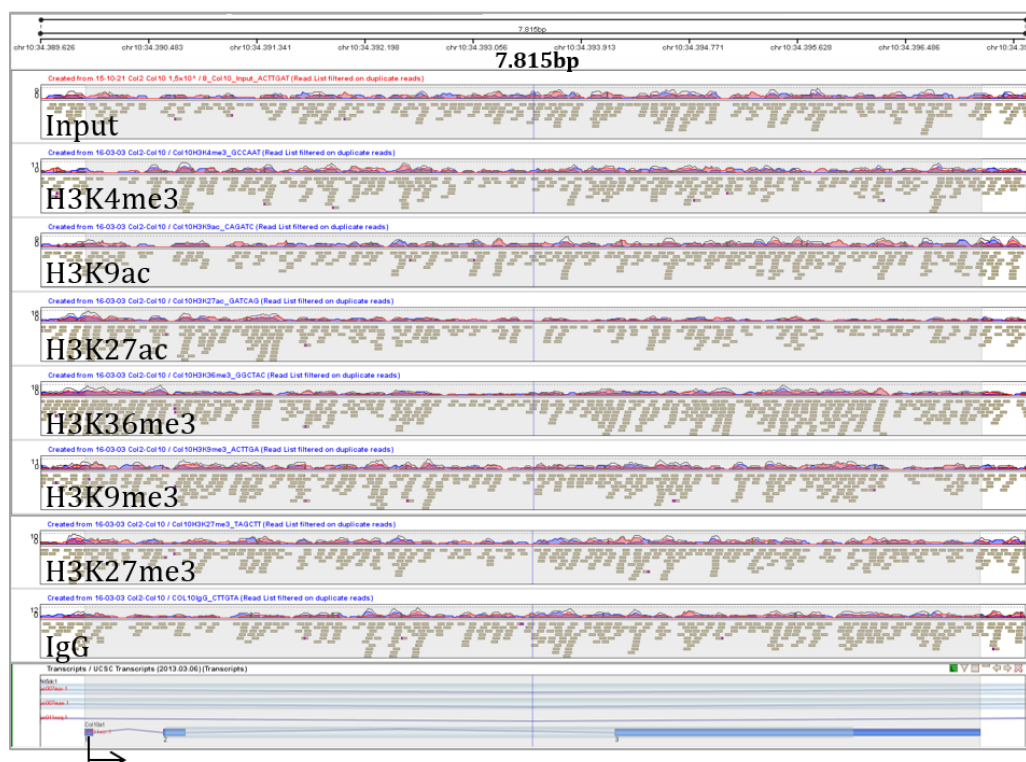
Proliferierende Chondrozyten

Col10a1 chr10:34389626-34397440



Hypertrophe Chondrozyten

Col10a1 chr10:34389626-34397440



ES

Col10a1 chr10:34389626-34397440

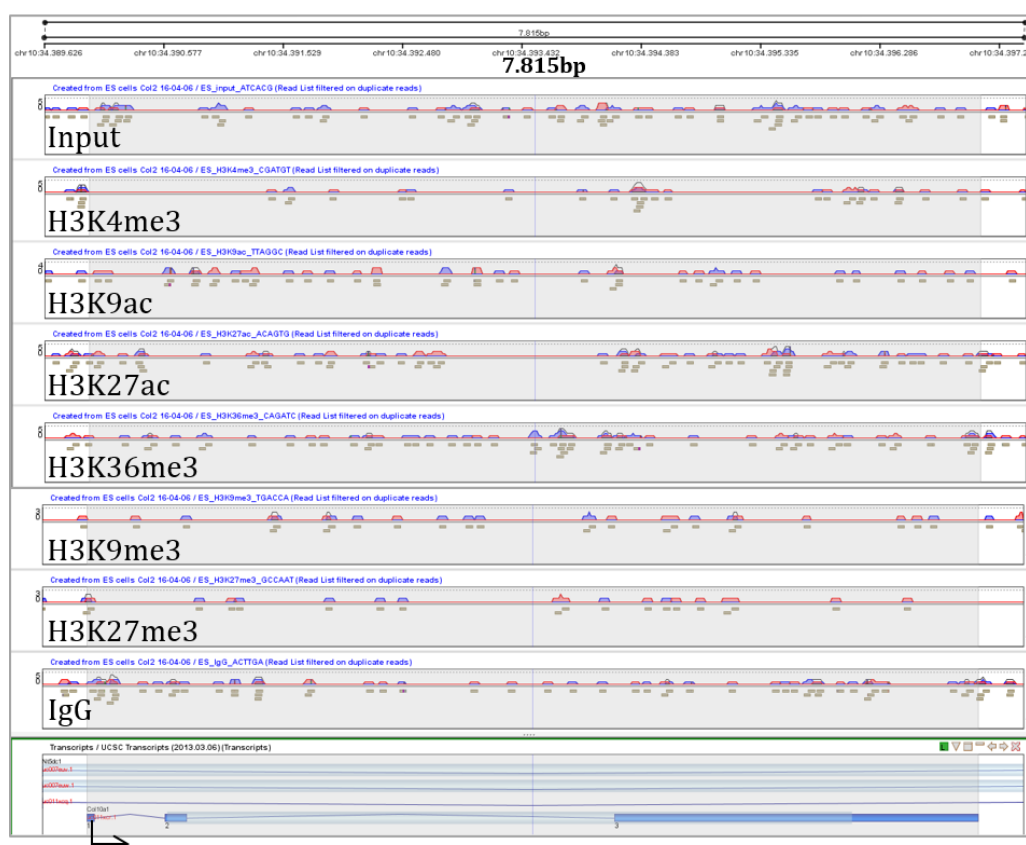


Abb. 23 Hypertrophe Chondrozyten zeigen eine hohe Read-Dichte aller Histonmodifikationen am *Col10a1*-Gen

Das *Col10a1*-Gen ist auf Chromosom 10 (chr10:34.389.626-34.397.440) lokalisiert und besteht aus 3 Exons (blaue Kästchen). Das *Col10a1*-Gen liegt in der Intronsequenz (blaue Linie) des *Nt5dc1* (5'-nucleotidase domain containing 1)-Gens. Im Gegensatz zu den hypertrophen Chondrozyten, bei denen eine Vielzahl von Reads detektiert wurde, zeigten sowohl die proliferierenden Chondrozyten als auch die ES-Zellen nur sehr wenige Reads für die Modifikationen. Es ist ein Bildausschnitt von 7.815 bp dargestellt.

Aufgrund des unerwarteten Auftretens von unspezifischen Bindungen am *Col2a1*-Gen in proliferierenden- und am *Col10a1*-Gen in hypertrophen Chondrozyten, wurden weitere Chondrozyten-spezifische und ES-Zell-spezifische Gene untersucht, um die Veränderungen der Histonmodifikationen mit der transkriptionellen Aktivität korrelieren zu können.

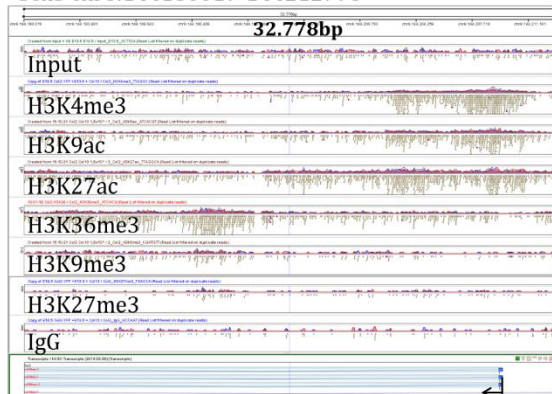
Die Sox9 Koaktivatoren *Sox5* und *Sox6* zeigten, wie erwartet, eine starke Anreicherung von aktivierenden Histonmodifikationen in proliferierenden Chondrozyten und wenig reprimierende Markierungen (Abb. 24a, b). Damit ähneln sich die Anreicherungsprofile aller drei Sox-Familienmitglieder in proliferierenden Chondrozyten. Die *Sox5*-Sequenz zeigte in hypertrophen Chondrozyten einen leichten H3K4me3- und H3K27me3-Peak, während in ES-Zellen keine Read-Anreicherungen aller Histonmodifikationen zu finden waren (Abb. 24c, e). Im *Sox6*-Gen hingegen traten sowohl in hypertrophen Chondrozyten, als auch in ES-Zellen Anreicherungen von drei der vier aktivierenden Marker (H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac) auf, lediglich der Transkript Elongationsmarker H3K36me3 fehlte. Zudem wurde in beiden Zellpopulationen die reprimierende H3K27me3 Markierung nachgewiesen (Abb. 24d, f).

Obwohl *Sox5*, *Sox6* und *Sox9* in proliferierenden Chondrozyten gemeinsame Funktionen aufweisen, scheint ihre epigenetische Regulation in ES-Zellen und hypertrophen Chondrozyten unterschiedlich zu sein. Während der Differenzierung in hypertrophe Chondrozyten scheinen *Sox5* und *Sox9* früher als *Sox6* herunterreguliert zu werden, da die Anzahl der Reads, inklusive Read-Dichte und Peak-Höhe von *Sox6* in hypertrophen Chondrozyten im Vergleich zu *Sox5* und *Sox9* noch stark erhöht ist (Abb. 21; Abb. 24).

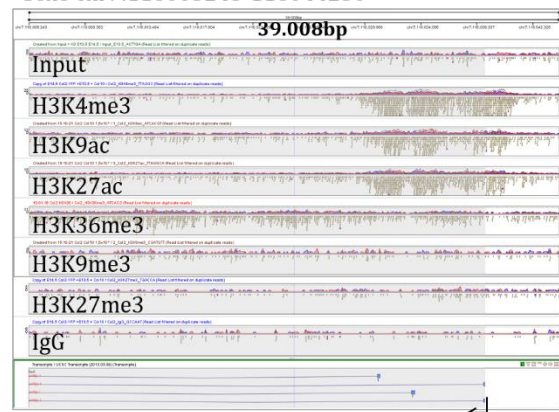
In ES-Zellen hat *Sox5* weder eine aktivierende noch eine reprimierende Markierung, wohingegen *Sox6* und *Sox9* *geprimt* vorliegen. Dies könnte auf ein frühes *Priming* der Chondrozyten-spezifischen Gene oder auf eine Rolle in der Differenzierung in andere Gewebe hinweisen.

a) Proliferierende Chondrozyten

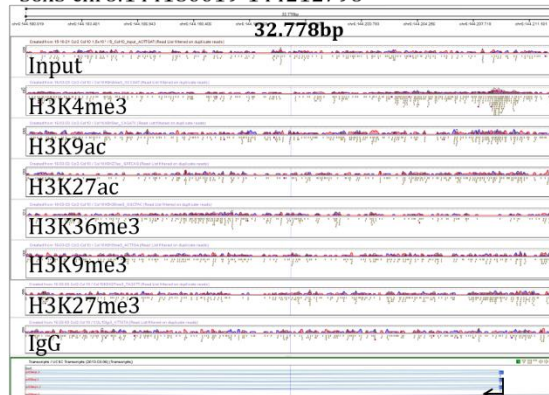
Sox5 chr6:144180019-144212796

**b) Proliferierende Chondrozyten**

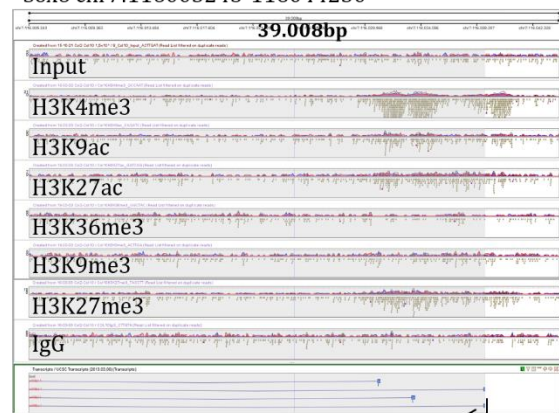
Sox6 chr7:116005243-116044250

**c) Hypertrophe Chondrozyten**

Sox5 chr6:144180019-144212796

**d) Hypertrophe Chondrozyten**

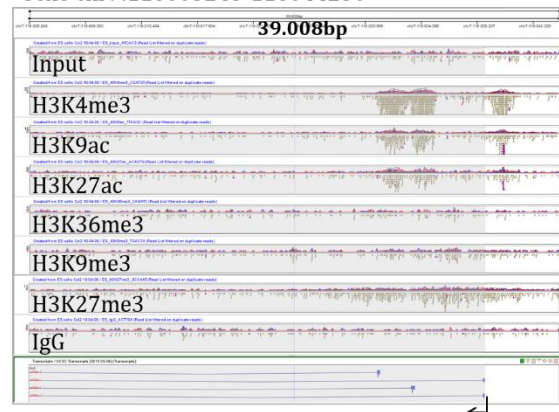
Sox6 chr7:116005243-116044250

**e) ES**

Sox5 chr6:144180019-144212796

**f) ES**

Sox6 chr7:116005243-116044250

**Abb. 24 Transkriptionelle Aktivität von Sox5 und Sox6 in proliferierenden Chondrozyten**

Sox5 (a, c, e) und Sox6 (b, d, f) weisen in proliferierenden Chondrozyten (a, b) eine transkriptionelle Aktivität auf, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten (c, d) oder in ES-Zellen (e, f). Das Sox5-Gen ist in einem Bildausschnitt von 32.778 bp des Chromosoms 6 (chr6:144.180.019-144.212.796) dargestellt. Die Promotorregion mit der TSS (Pfeil) und das erste Exon (blaues Kästchen) befinden sich in diesem Bereich. Es sind drei der möglichen sieben Transkripte dargestellt. Das Sox6-Gen im Bereich von 39.008 bp ist auf Chromosom 7 (chr7:116.005.243-116.044.250) lokalisiert, nur die Promotorsequenz von vier der möglichen neun Transkripte ist dargestellt.

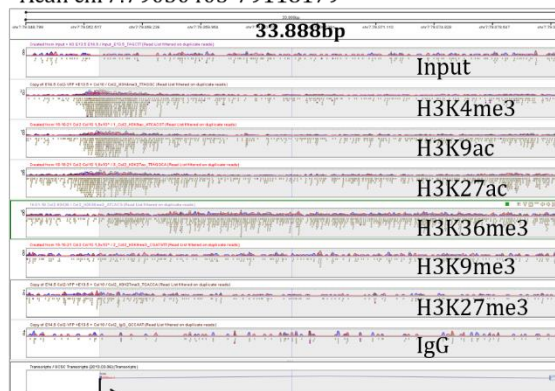
Die drei Transkriptionsfaktoren Sox5, Sox6 und Sox9 aktivieren neben *Col2a1* auch *Aggrecan* (*Acan*), ein Chondrozyten-spezifisches Proteoglykan der EZM, welches wie *Col2a1* in allen proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird (Han und Lefebvre, 2008). Im Gegensatz zu *Col2a1* wies das *Acan*-Gen keine unspezifischen Readblöcke, sondern ein typisches Histonmodifikations-Muster für transkriptionell-aktive Gene auf (Abb. 25a). Von den proliferierenden- zu den hypertrophen Chondrozyten sank die Anreicherung aller aktivierenden Histonmodifikationen (Abb. 25a, c). Während H3K36me3 nicht mehr detektiert werden konnte, war die reprimierende H3K27me3-Markierung gesteigert. In ES-Zellen zeigten sich nur sehr schmale Peaks von H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac an der TSS im Vergleich zu den Chondrozyten, außerdem lag die reprimierende H3K27me3 Markierung vor (Abb. 25e), womit *Acan*, sowohl in hypertrophen Chondrozyten als auch in ES-Zellen, wie *Sox9* durch das bivalente Modifikationsmuster markiert ist.

Während Sox9 die frühe Chondrozytendifferenzierung reguliert, ist Runx2 für die Initiation der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung verantwortlich.

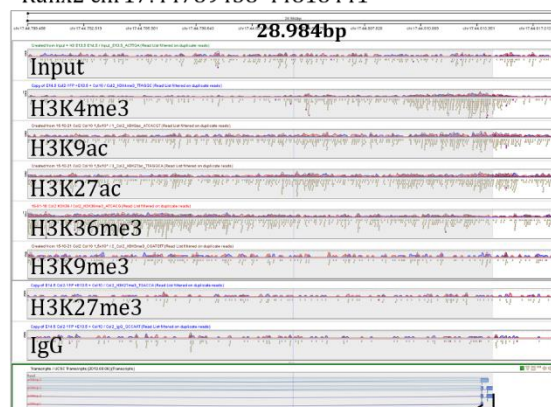
In proliferierenden Chondrozyten wurden am *Runx2*-Gen alle aktivierenden und keine reprimierenden Histonmodifikationen detektiert (Abb. 25b). Unerwarteterweise wurden in hypertrophen Chondrozyten nur noch geringe Anreicherungen von H3K4me3 und H3K9ac an der TSS von *Runx2* gefunden. Dies deutet auf ein Herunterregulieren der Runx2 Expression in hypertrophen Chondrozyten hin (Abb. 25d). In ES-Zellen zeigten sich keine Anreicherungen (Abb. 25f).

a) Proliferierende Chondrozyten

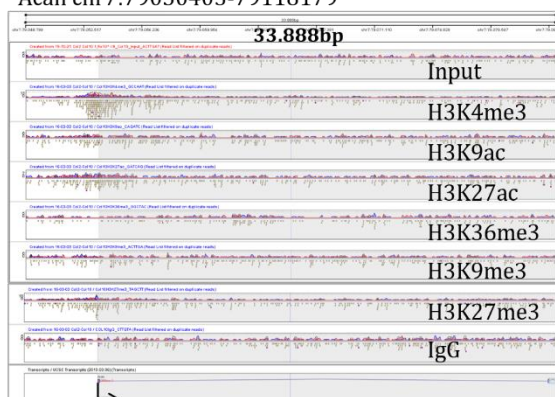
Acan chr7:79050403-79118179

**b) Proliferierende Chondrozyten**

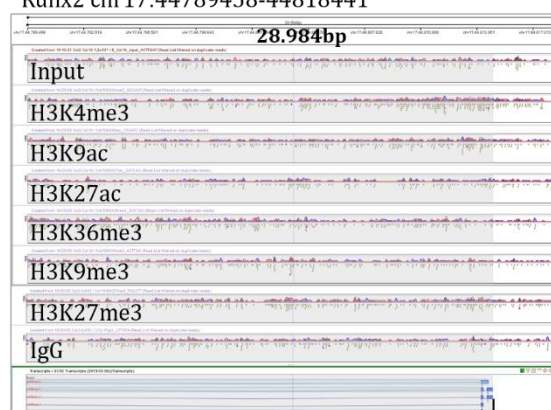
Runx2 chr17:44789458-44818441

**c) Hypertrophe Chondrozyten**

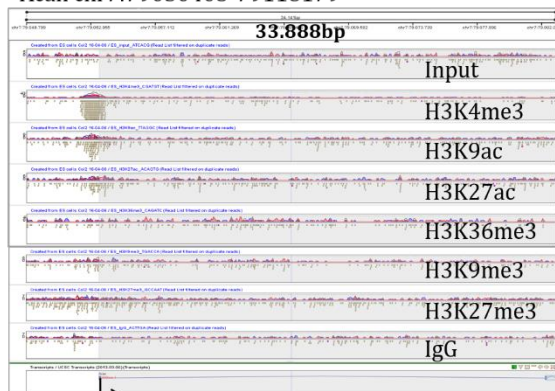
Acan chr7:79050403-79118179

**d) Hypertrophe Chondrozyten**

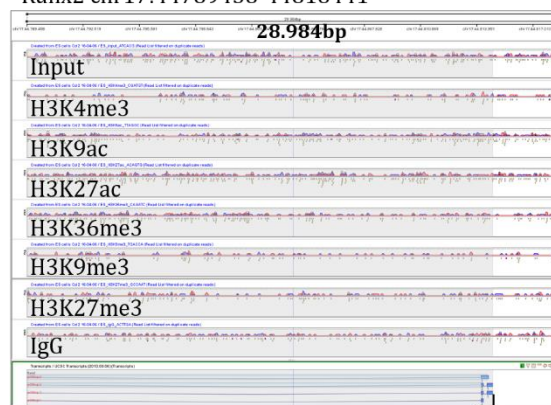
Runx2 chr17:44789458-44818441

**e) ES**

Acan chr7:79050403-79118179

**f) ES**

Runx2 chr17:44789458-44818441

**Abb. 25 Runx2 weist nur in proliferierenden Chondrozyten auf eine aktive Transkription hin**

Aggrecan (*Acan*) (a, c, e) und *Runx2* (b, d, f) weisen beide nur in proliferierenden Chondrozyten (a, b) Markierungen der aktiven Transkription auf und nicht in hypertrophen Chondrozyten (c, d) oder ES-Zellen (e, f). Das *Acan*-Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert (chr7:79.050.403-79.118.179), nur die Promotorregion mit der TSS (Pfeil) und die ersten beiden Exons (blaues Kästchen) und der erste Intronbereich (blaue Linie) sind im Bildausschnitt von 33.888 bp dargestellt. Das *Runx2*-Gen ist auf Chromosom 17 (chr17:44.789.458-44.818.441) lokalisiert, nur die P1 Promotorsequenz von vier der fünf möglichen Transkripte ist mit einem Bildausschnitt von 28.984 bp dargestellt. Vom ersten und vierten möglichen Transkript liegt nur das erste

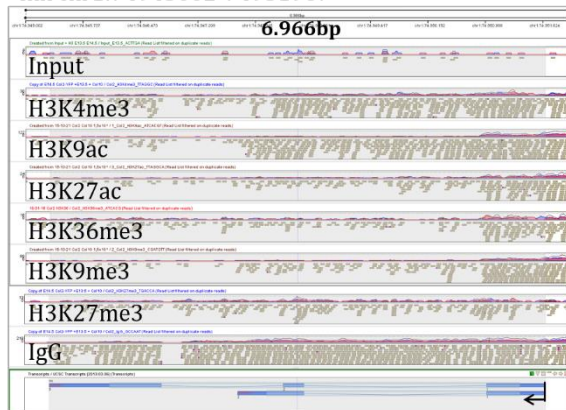
Exon im Bildausschnitt, vom zweiten und dritten möglichen Transkript liegen Exon 1 und 2 in dieser Gensequenz. Die Annotation wurde mit UCSC vorgenommen.

Ein Zielgen von Runx2 ist *Indian hedgehog (Ihh)* (Yoshida et al., 2004). Ihh wird in prähypertrophen Chondrozyten exprimiert und aktiviert die Chondrozytenproliferation mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Gli3 (St-Jacques et al., 1999). Das *Ihh*-Gen wies im Gegensatz zum *Col2a1*- und *Col10a1*-Gen in allen Zelltypen unspezifische Read-Anreicherungen in Blöcken um die TSS auf, die jedoch unterschiedliche Modifikationen in den drei Zelltypen betrafen (Abb. 26a, c, e). Es traten bei allen drei Zelltypen zwei Arten von Anreicherungsprofilen auf. Das erste umfasste die TSS und das erste Exon, während das zweite Anreicherungsprofil auch das zweite Exon betraf (Abb. 26a, c, e). Die Anreicherung von H3K36me3, außerhalb der unspezifischen Readblöcke, trat nur in proliferierenden Chondrozyten auf. Außerdem wurden in proliferierenden Chondrozyten unspezifische Bindungen des IgGs über die gesamte Genlänge detektiert, nur der Input zeigte keine Anreicherung (Abb. 26a). Welche Änderungen der Chromatinstruktur vorliegen müssen, damit dieses Modifikationsprofil entsteht, ist noch nicht bekannt.

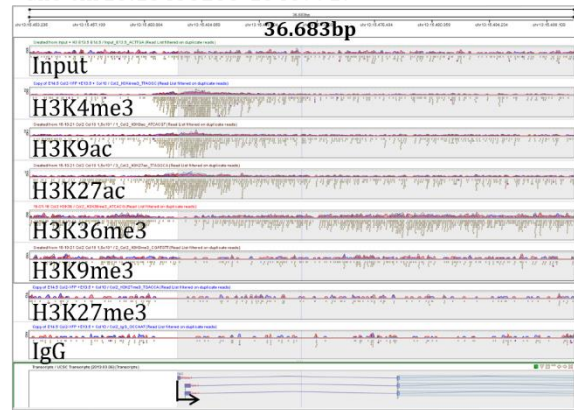
Im Gegensatz zu *Ihh* zeigte *Gli3* in proliferierenden Chondrozyten ein typisches Histonmodifikations-Muster für transkriptionell-aktive Gene (Abb. 26b). Die hypertrophen Chondrozyten und die ES-Zellen wiesen, zusätzlich zu aktivierenden Markierungen, die reprimierende Markierung H3K27me3 auf (Abb. 26d, f).

a) Proliferierende Chondrozyten

Ihh chr1:74945002-74951967

**b) Proliferierende Chondrozyten**

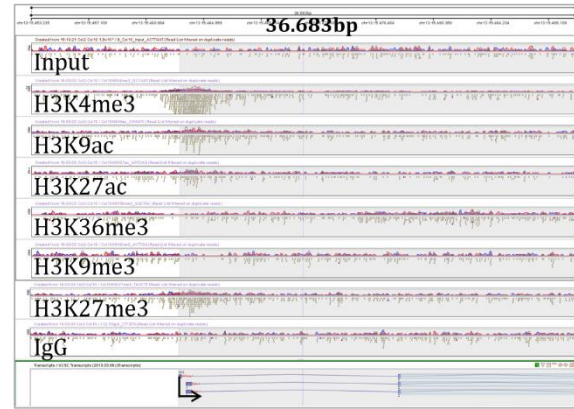
Gli3 chr13:15453235-15489917

**c) Hypertrophe Chondrozyten**

Ihh chr1:74945002-74951967

**d) Hypertrophe Chondrozyten**

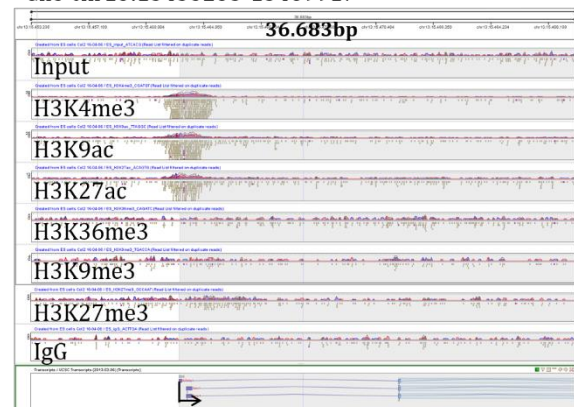
Gli3 chr13:15453235-15489917

**e) ES**

Ihh chr1:74945002-74951967

**f) ES**

Gli3 chr13:15453235-15489917

**Abb. 26 Untersuchung von *Ihh* und seines Zielgens *Gli3***

Die Gensequenzen des Signalmoleküls *Ihh* (*Indian hedgehog*) (a, c, e) und des durch *Ihh* aktivierten Transkriptionsfaktors *Gli3* (b, d, f) sind in proliferierenden- und (a, b) hypertrophen Chondrozyten (c, d), sowie in ES-Zellen (e, f) dargestellt. Das *Ihh*-Gen ist auf Chromosom 1 lokalisiert (chr1:74.945.002-74.951.967), die gesamte Gensequenz mit der TSS (Pfeil) und den möglichen beiden Transkripten mit drei (oben) bzw. zwei Exons (blaues Kästchen, unten) sind in einem Bildausschnitt von 6.966 bp dargestellt. Das *Gli3*-Gen ist auf Chromosom 13 (chr13:15.453.235-15.489.917) lokalisiert, nur die Promotorsequenz

inklusive der ersten beiden Exons der drei möglichen Transkripte sind in einem Bildausschnitt von 26.683 bp dargestellt.

Interessanterweise zeigten einige spezifische Gene der proliferierenden Chondrozyten, wie *Sox9*, *Sox6*, *Gli3*, *Col2a1* und *Acan* eine bivalenten Markierungen durch H3K4me3 und H3K27me3 nicht nur in ES-Zellen, sondern auch in hypertrophen Chondrozyten. Somit könnte sowohl zur Initiation als auch zur Termination der Transkription ein bivalentes Muster vorliegen. Zusätzlich zur bivalenten Markierung traten Anreicherungen von H3K9ac und H3K27ac auf, jedoch fehlte immer der Transkript Elongationsmarker H3K36me3. Zudem wurden auch Gene entdeckt, die in proliferierenden Chondrozyten aktiv waren, wie *Runx2* und *Sox5*, aber in ES-Zellen und hypertrophen Chondrozyten nicht bivalent markiert waren.

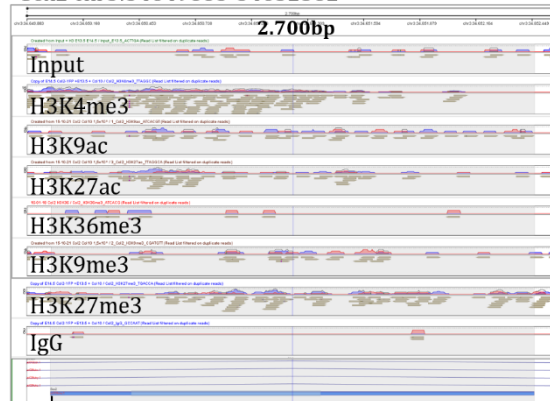
Um die Qualität der ChIP-Daten zu überprüfen, wurden die ES-Zell-spezifischen Genen, *Oct4* und *Sox2*, sowie das für die Neurogenese spezifische Gen *Neurod1*, analysiert, die nicht in Chondrozyten exprimiert werden. Während in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten keine transkriptionelle Aktivität am *Oct4*-Gen nachgewiesen wurde, zeigte das Gen in ES-Zellen eine starke Anreicherung von allen vier aktivierenden Markern über die gesamte Gensequenz (Abb. 27). Ein ähnliches Bild ergab sich beim *Sox2*-Gen, welches komplett mit aktivierenden Modifikationen markiert wurde. Beide ES-Zell-spezifischen Gene zeigten keine reprimierenden Markierungen in ES-Zellen. Das *Sox2*-Gen wies, anders als das *Oct4*-Gen, eine Anreicherung von H3K4me3 in proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten auf, wobei in proliferierenden Chondrozyten zusätzlich eine Repression durch H3K27me3 vorlag. Interessanterweise wiesen die ES-Zell-spezifischen Gene in Chondrozyten ebenfalls ein bivalentes Muster der Transkriptions-Termination auf. Während bei *Oct4* bereits alle Modifikationen entfernt worden waren, wies *Sox2* in proliferierenden Chondrozyten das bivalente Muster auf, während in hypertrophen Chondrozyten nur noch H3K4me3 Anreicherungen zu finden waren. Möglicherweise wird nach der Termination der Transkription H3K27me3 vor H3K4me3 entfernt.

a) Proliferierende Chondrozyten

Oct4 chr17:35505795-35511014

**b) Proliferierende Chondrozyten**

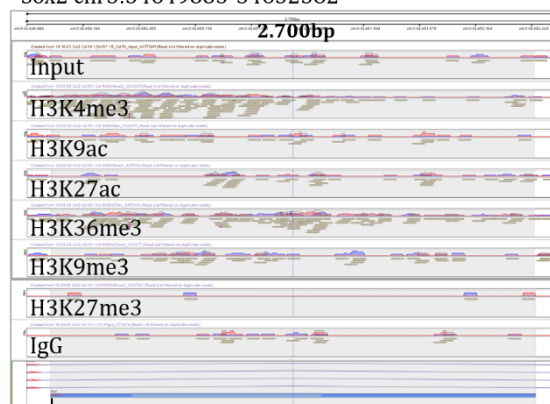
Sox2 chr3:34649883-34652582

**c) Hypertrophe Chondrozyten**

Oct4 chr17:35505795-35511014

**d) Hypertrophe Chondrozyten**

Sox2 chr3:34649883-34652582

**e) ES**

Oct4 chr17:35505795-35511014

**f) ES**

Sox2 chr3:34649883-34652582



Abb. 27 Die ES-Zell-spezifischen Gene, *Oct4* und *Sox2*, zeigen eine hohe Anreicherung von aktivierenden Markierungen in ES-Zellen

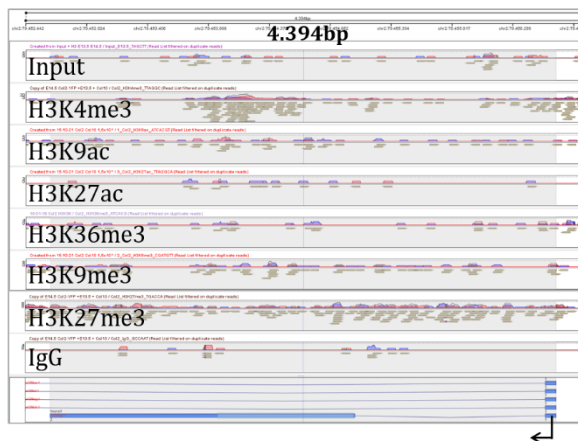
Die Stammzellmarkergene *Oct4* (a, c, e) und *Sox2* (b, d, f) weisen eine transkriptionelle Aktivität durch alle aktivierenden Markierungen in ES-Zellen (e, f), jedoch nicht in Chondrozyten (a-d) auf. Das *Oct4*- Gen ist auf Chromosom 17 lokalisiert (chr17:35.505.795-35.511.014), das gesamte Gen mit der TSS (Pfeil) ist mit einem Bildausschnitt von 5.229 bp dargestellt. Es sind vier der sieben möglichen Transkripte dargestellt, wobei das erste aus fünf Exons (blaue Kästchen), das zweite aus vier und das dritte aus drei Exons besteht. Die Introns sind als blaue Linie dargestellt. Das unterste Transkript aus zwei Exons gehört zum *Gm19553*

Gen. Das *Sox2*-Gen ist auf Chromosom 3 (chr3:34.649.883-34.652.582) lokalisiert. Das gesamte Gen, bestehend aus einem Exon, ist mit einem Bildausschnitt von 2.700 bp dargestellt. *Sox2* liegt in der Intronsequenz des *Sox2 overlapping transcript (SOX2OT)*.

Um nachzuweisen, ob nur für die Chondrozytendifferenzierung relevante Gene und nicht alle Entwicklungs-relevanten Gene aktivierende Histonmodifikationen tragen, wurde das Gen *Neurod1* (*Neuronal Differentiation 1*) analysiert, welches spezifisch die Neurogenese steuert (D'Amico et al., 2013). Die *NeuroD1* TSS stimmt mit der TSS eines weiteren Gens, *Cerkl* (Ceramide kinase like) überein. *Cerkl* wird, wie *Neurod1*, in der Augenentwicklung benötigt und es ist nicht beschrieben, dass es in Chondrozyten exprimiert wird (Mandal et al., 2013). In ES-Zellen lagen leichte Anreicherungen von aktivierenden Modifikationen vor, jedoch keine transkriptionelle Aktivität durch die H3K36me3 Markierung (Abb. 28c). In Chondrozyten war nur eine leichte Anreicherung von H3K4me3 und eine reprimierende Markierung in proliferierenden Chondrozyten zu finden (Abb. 28a, b). Keine der Zelltypen zeigte eine Anreicherung von H3K36me3 (Abb. 28).

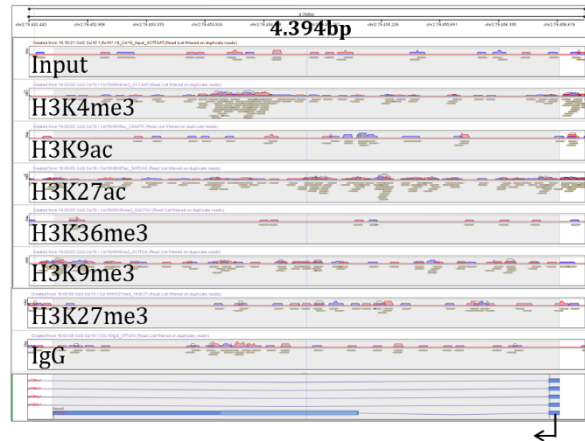
a) Proliferierende Chondrozyten

Neurod1 chr2:79452442-79456835



b) Hypertrophe Chondrozyten

Neurod1 chr2:79452442-79456835



c) ES

Neurod1 chr2:79452442-79456835



Abb. 28 *Neurod1* zeigt keine Anreicherungen in Chondrozyten

Das neuronale Gen *Neurod1* (a, b, c) zeigt nur in den ES-Zellen (c) und nicht in den proliferierenden (a) und hypertrophen Chondrozyten (b) Anreicherungen. Das *Neurod1*-Gen ist auf Chromosom 2 lokalisiert (chr2:79.452.442-79.456.835), das gesamte Gen, bestehend aus zwei Exons (blaue Kästchen) mit der TSS (Pfeil), ist in einem Bildausschnitt von 4.394 bp dargestellt. Die TSS wird mit einem weiteren Gen *Cerkl* (Ceramide kinase like) geteilt, deren vier mögliche Transkripte über der *Neurod1* Sequenz zu sehen sind.

Im Allgemeinen konnte die Aktivität der Chondrozyten-spezifischen Gene durch die Kombination der vier aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 sehr gut bestätigt werden. Ebenso konnte H3K27me3 als reprimierende Modifizierung an Zelltyp-spezifischen Genen verifiziert werden. Spezifische Anreicherungen von H3K9me3 wurden nicht an den untersuchten Gensequenzen detektiert, da es möglicherweise nur weiter *up-* oder *downstream* von Genen zur Heterochromatin-Bildung benötigt wird. Überraschenderweise war die Termination der Transkription in Chondrozyten mit dem Auftreten der bivalenten Markierung verbunden, die bisher nur für die ES-Zell-Regulation bekannt war.

4.3.2 Exklusiv aktive Gene in proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten spiegeln den Zelltyp wieder

Exprimierte Gene wurden durch die Markierungen aller vier aktivierenden Histonmodifikationen identifiziert. Um gleiche statistische Vorraussetzungen zu schaffen, wurden jeweils zwei Datensätze von proliferierenden Chondrozyten mit zwei Datensätzen der hypertrophen Chondrozyten verglichen. In proliferierenden Chondrozyten wurden 7.924 Gene gefunden, bei denen jeweils Peaks für alle aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) nachgewiesen werden konnten. Die hypertrophen Chondrozyten zeigten mit 8.261 Genen eine leicht höhere Anzahl an transkriptionell-aktiven Genen. Von diesen Genen waren 6.631 Gene in beiden Chondrozyten-Populationen markiert. 1.293 Gene waren ausschließlich in proliferierenden Chondrozyten und 1.630 Gene ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten aktiviert.

Eine GO (*Gene Ontology*)-Analyse mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ der 6.631 gemeinsamen Gene zeigte eine Zuordnung in 1.251 GO-Terms (Untergruppen). Dabei wurde nach typischen Knochen- und Knorpel-, aber auch nach Zellzyklus-, Apoptose- und

Zelldifferenzierungs-Gruppen gesucht. Die gemeinsamen Gene wurden jedoch hauptsächlich in unspezifische Gruppen wie „*Cellular Function*“ und „*Molecular Function*“ mit vielen verschiedenen metabolischen Prozessen eingeordnet.

Eine GO-Analyse der 1.293 ausschließlich in proliferierenden Chondrozyten aktiven Gene, zeigte eine Aufteilung in 55 GO-Terms (Untergruppen). Dabei wurde eine Vielzahl von Knochen- und Knorpel-spezifischen GO-Terms identifiziert, wie zum Beispiel „*Skeletal System Development*“, „*Skeletal System Morphogenesis*“, „*Cartilage Development*“, „*Regulation of Wnt Signaling Pathway*“, „*Ossification*“, „*Extracellular Matrix Organisation*“ und „*Collagen Fibril Organisation*“. Dabei beinhalteten allen Untergruppen identische Gene, wie z. B. wichtige Signalmoleküle und Rezeptoren des Bmp (bone morphogenetic protein)-Signalwegs (*Bmp5*, *Bmp6*, *Bmp7*, *Bmpr1*), Moleküle des Wnt-Signalwegs (*Wnt5a*, *Wnt11*) oder Transkriptionsfaktoren, die bereits in Chondrozyten beschrieben wurden, wie *Mef2c*, *Gli1* und *Twist-related protein 1 (TWIST1)*, aber auch Hox-Gene (*Hoxb3*, *Hoxc4*, *Hoxb5*, *Hoxb6*), die den Lageplan des Körpers festlegen. Es wurde eine Vielzahl von Genen identifiziert, welche für EZM-Moleküle (*Col2a1*, *Acan*, *Col1a1-2*, *Col9a1-3*, *Col11a1-2*) und EZM-abbauende Enzyme (*Adamts14*, *Mmp2*) kodieren. GO-Terms für Anreicherungen von Zellzyklus- oder Apoptose-spezifischen Genen fanden sich in proliferierenden Chondrozyten nicht.

Die Signalweganalyse der ausschließlich in proliferierenden Chondrozyten aktiven Gene zeigte die höchste Signifikanz ($p=1,7 \times 10^{-6}$) für den Terminus „*Endochondral Ossification*“ (Tab. 5). Dieser enthielt die 12 Gene: *Sox9*, *Col2a1*, *Acan*, *Mef2c*, *Akt1*, *Bmp6*, *Bmp7*, *Stat1* (*Signal transducer and activator of transcription 1*), *Ctsl* (*Cathepsin L1*), *Enpp1* (*Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1*), *Frzb* (*Frizzled-Related Protein*) und *Mgp* (*Matrix gla protein*) (Abb. 29). Das Auftreten der proliferierenden Chondrozyten-spezifischen Marker, *Sox9*, *Col2a1* und *Acan*, bestätigt die reine Population von proliferierenden Chondrozyten, da diese Gene in hypertrophen Chondrozyten ausgeschaltet sind (Abb. 29). Unter den Signalwegen mit den zehn höchsten Signifikanzen befanden sich zudem solche, wie „*Focal Adhesion*“, „*Purin-Metabolism*“ und „*Protein-Protein-Interaction*“ (Tab. 5).

Signalwege aktivierter Gene in ausschließlich proliferierenden Chondrozyten	p=Wert	Aktivierte Gene	Signalweg-einträge
Mm_Endochondral_Ossification_WP1270_72216	1.7110207E-6	12	62
Mm_Focal_Adhesion_WP85_78289	2.5355187E-6	21	185
Mm_Purine_metabolism_WP2185_77716	1.092961E-5	19	196
Mm_XPodNet_-_protein-protein_interactions_in_the_podocyte_expanded_by_STRING_WP2309_72004	7.24393E-5	52	836
Mm_Neural_Crest_Differentiation_WP2074_69080	1.792812E-4	12	97
Mm_Insulin_Signaling_WP65_78424	0.0015761806	14	159
Mm_PodNet_-_protein-protein_interactions_in_the_podocyte_WP2310_72005	0.0023439282	22	315
Mm_Splicing_factor_NOVA_regulated_synaptic_proteins_WP1983_78426	0.0024488277	6	42
Mm_Focal_Adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling_pathway_WP2841_80222	0.006327459	21	327
Mm_Focal_Adhesion-PI3K-Akt-mTOR-signaling_pathway_WP2841_79834	0.006327459	21	327

Tab. 5 Signalweg Analyse von proliferierenden Chondrozyten

Die Signalweg Analyse mit StrandNGS zeigt die ersten zehn Signalwege von proliferierenden Chondrozyten, bei denen eine signifikante Anreicherung aller vier aktivierender Histonmodifikationen gefunden wurde. Dazu wurden nur Gene verwendet, bei denen gleichzeitig H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 nachgewiesen wurden und die zugleich nicht in hypertrophen Chondrozyten zu finden waren. Die Tabelle zeigt den Signalweg, den dazugehörigen Signifikanzwert (p-Wert; $p < 0,05$), die Anzahl der in diesem Datensatz identifizierten Gene des Signalwegs und die Gesamtzahl der Gene des spezifischen Signalwegs.

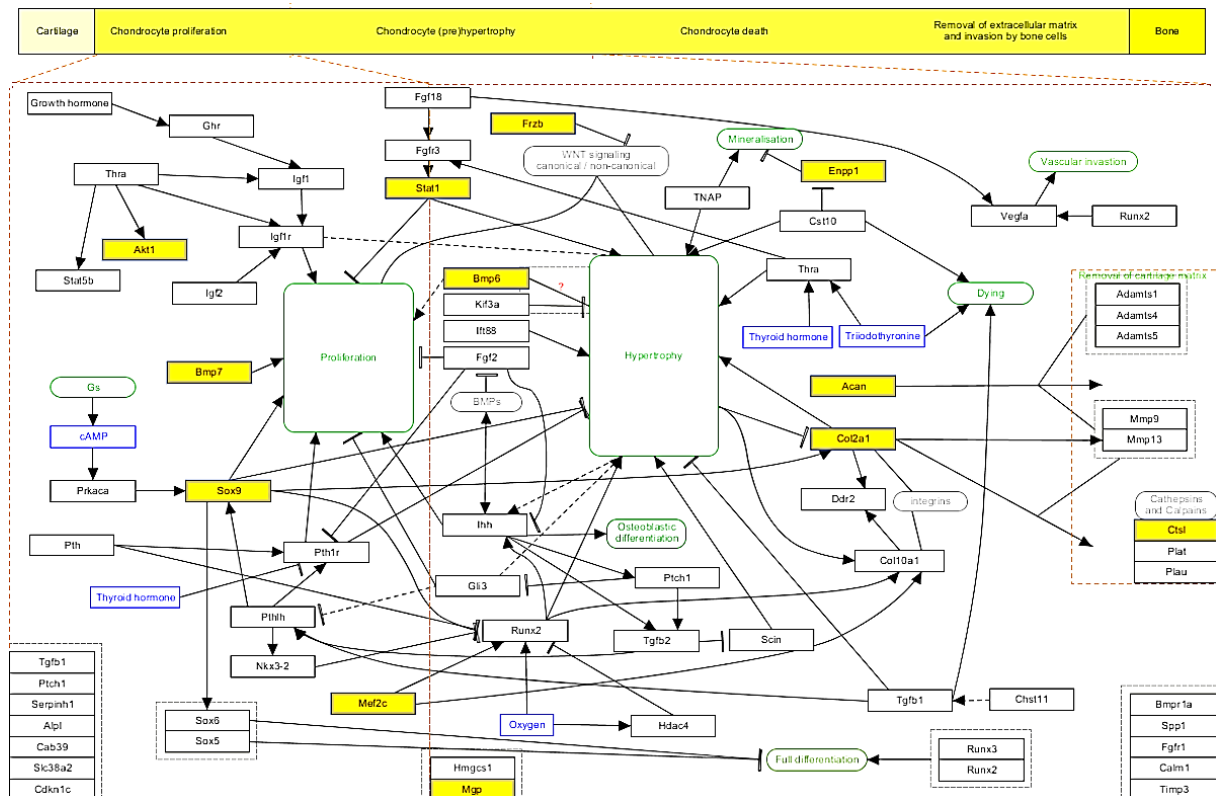


Abb. 29 Gene der „endochondralen Ossifikation“ wurden in proliferierenden Chondrozyten durch alle aktivierenden Histonmodifikationen markiert

Die Signalwegkarte der „Endochondral Ossification“ zeigt alle identifizierten Gene (gelbe Kästchen) im Signalweg. Diese Gene wurden nur in proliferierenden- aber nicht in hypertrophen Chondrozyten gefunden und wiesen alle vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) auf. Die Signalwegkarte wird unterteilt in Chondrozyten-Proliferation (linker Kasten, gestrichelt orange) und in Chondrozyten (Prä)-Hypertrophie (rechter Kasten, gestrichelt orange). Die Signalweg Analyse wurde mit StrandNGS durchgeführt ($p < 0,05$).

Die 1.630 aktivierten Gene der hypertrophen Chondrozyten wurden in 101 GO-Terms unterteilt. Im Gegensatz zu den proliferierenden Chondrozyten wurden keine der Knochen- und Knorpel-spezifischen GO-Terms gefunden.

Hauptsächlich waren GO-Terms zu mitochondrialen und ribosomalen Prozessen, sowie zur RNA-Prozessierung vorhanden. Zudem wurden apoptotischen GO-Terms wie „Death“ und „Cell death“ gefunden. Darin waren die typischen Apoptose einleitenden Gene *Bad* (*Bcl-2-associated death promoter*), *Bax* (*Bcl-2-associated X protein*), *Bak1* (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), *Bcl3* (*B-cell lymphoma 3-encoded protein*), *Csnk2a2* (*Casein Kinase 2, Alpha Prime Polypeptide*) und *Dnase2*, sowie die Zellzyklus-abhängigen Kinase-Inhibitoren *Cdkn1a* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1a (p21, Cip1)*) und *Cdkn1b* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1b (p27, Kip1)*), welche im Verlauf der Hypertrophie vermehrt

exprimiert werden (Elmore, 2007; Stewart et al., 1997). Neben pro-apoptotischen Genen, befanden sich auch anti-apoptotische Gene, wie *Bcl2l* (*Bcl2-like 1*), *Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase Bub1* (*budding uninhibited by benzimidazoles 1*) und Gene, wie *Rad51* und *Plk3* (*Polo like kinase 3*) darunter, die nach DNA-Schäden aktiviert werden (Nyberg et al., 2002).

In der Signalweg Analyse der hypertrophen Chondrozyten wurden, wie in der GO-Analyse, keine Knorpel- oder Knochen-spezifischen Signalwege gefunden. In den zehn signifikantesten Signalwegen wurden der Apoptose-Signalweg (Abb. 30) und mehrere metabolische Signalwege detektiert, die mit der Größenzunahme der hypertrophen Chondrozyten zusammenhängen könnten (Tab. 6). Viele zur Apoptose wichtigen Gene, wie *Bad*, *Bax*, *Bad1* und *Caspase8* wurden im Apoptose Signalweg der hypertrophen, aber nicht in proliferierenden Chondrozyten nachgewiesen (Abb. 30).

Signalwege aktivierter Gene in ausschließlich hypertrophen Chondrozyten	p=Wert	Aktivierte Gene	Signalweg-einträge
Mm_mRNA_processing_WP310_78419	7.155665E-10	52	549
Mm_TNF-alpha_NF-kB_Signaling_Pathway_WP246_69201	6.869557E-8	27	184
Mm_Cytoplasmic_Ribosomal_Proteins_WP163_78425	3.9378062E-7	16	80
Mm_Electron_Transport_Chain_WP295_79459	4.168878E-7	17	102
Mm_Oxidative_phosphorylation_WP1248_69092	1.3160015E-6	12	59
Mm_Purine_metabolism_WP2185_77716	2.3653088E-6	23	196
Mm_Eukaryotic_Transcription_Initiation_WP567_69915	8.240985E-6	10	41
Mm_Apoptosis_WP1254_69153	8.394774E-5	13	83
Mm_IL-7_Signaling_Pathway_WP297_69128	1.2720826E-4	9	44
Mm_p53_signaling_WP2902_80199	2.1639088E-4	11	109

Tab. 6 Signalweg Analyse aktivierter Gene von hypertrophen Chondrozyten

Die Signalweg Analyse mit StrandNGS zeigt die ersten zehn signifikant angereicherten Signalwege von hypertrophen Chondrozyten. Es wurden nur Gene verwendet, die mit allen vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) identifiziert wurden und nicht in proliferierenden Chondrozyten zu finden waren. Die Tabelle zeigt den Signalweg, den dazugehörigen Signifikanzwert (p-Wert; $p < 0,05$), die in diesem Datensatz aktivierten Gene des Signalwegs und die Gesamtzahl der Gene des spezifischen Signalwegs.

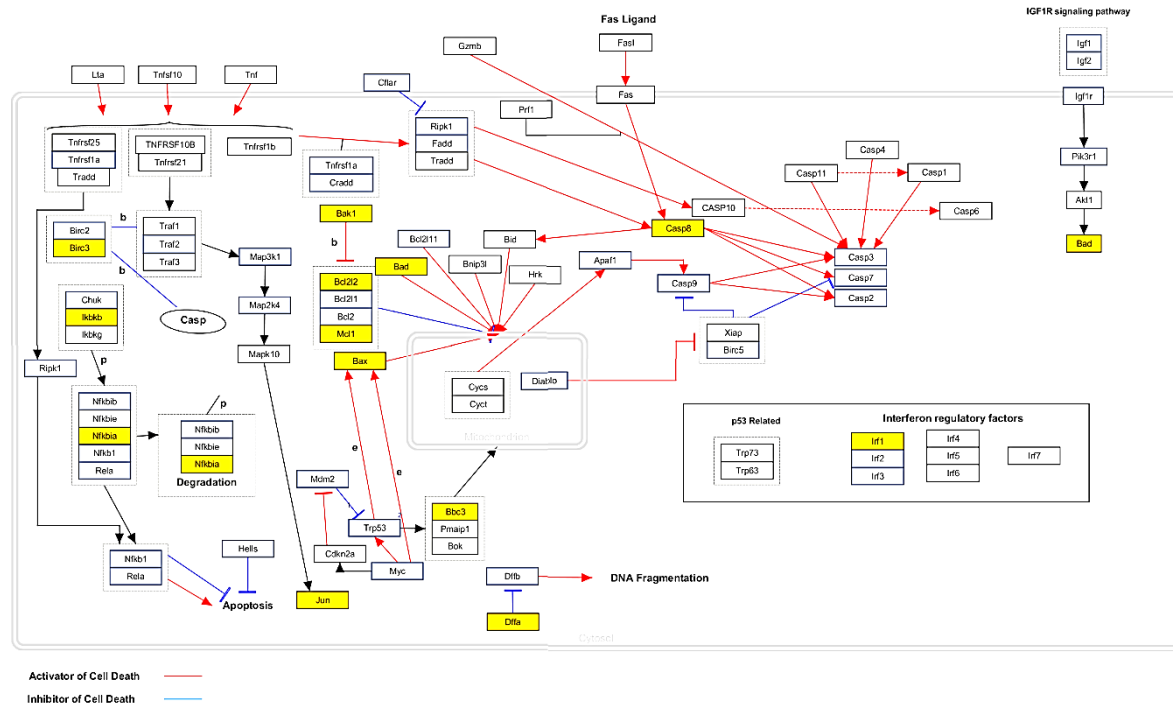


Abb. 30 In hypertrophen Chondrozyten wurde eine signifikante Anzahl an Genen des Apoptose Signalwegs als aktiviert markiert

Der Apoptose Signalweg zeigt alle aktivierten Gene (gelbe Kästchen) im Signalweg. Diese Gene wurden von allen vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten markiert. Die roten Pfeile zeigen Apoptose aktivierende- und die blauen Pfeile Apoptose inhibierende Signalwege.

Die Kombination der aktivierten Histonmodifikationen zeigte somit eine signifikante Anreicherung von Knorpel- und Knochen-spezifischen Signalwegen in proliferierenden Chondrozyten, während in hypertrophen Chondrozyten Apoptose-spezifische Gene aktiviert waren. Zudem befanden sich die Zellzyklus-Inhibitoren *p21* und *p27* ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten. Dies spiegelt den charakteristischen Zellzyklus Arrest der hypertrophen Chondrozyten wieder (Coqueret, 2003; Stewart et al., 1997).

4.3.3 Regulation der Chondrozytendifferenzierung durch die bivalente Gen-Markierung

Bei der Analyse von Zelltyp-spezifischen Genen in ES-Zellen und Chondrozyten wurde mehrfach das simultane Auftreten der Transkriptions-aktivierenden H3K4me3 und der reprimierenden H3K27me3 Markierung beobachtet. Diese Histonmodifikationen wurden als Charakteristika für bivalente Gene beschrieben, die in ES- und Progenitorzellen Entwicklungs-spezifische Gene steuern (Alder et al., 2010; Bernstein et al., 2006). Auffällig war das häufige Auftreten von bivalent markierten Genen in hypertrophen Chondrozyten, deshalb wurden die bivalent markierten Gene und die Veränderung der Histonmodifikationen im Verlauf der Differenzierung genauer untersucht.

4.3.3.1 Identifikation bivalent markierter Gene

Zur Identifikation bivalente markierter Genen in Chondrozyten und ES-Zellen wurden alle Datensätze hinsichtlich des gleichzeitigen Auftretens der Histonmodifikationen H3K4me3 und H3K27me3 untersucht. Hierfür wurden die durch H3K4me3 und H3K27me3 markierten Gene miteinander verglichen. Dabei wurde jeweils nur mit einem Datensatz von ES-Zellen und Chondrozyten gearbeitet, um statistisch gleiche Voraussetzungen zu schaffen (Tab. 7).

	Proliferierende C.	Hypertrophe C.	ES
H3K4me3	16.563	16.637	18.337
H3K27me3	5.030	11.343	7.710

Tab. 7 Anzahl der mit H3K4me3 und H3K27me3 markierten Gene

Die Genliste enthält jeweils ein Datensatz von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten, sowie von ES-Zellen und zeigt die Anzahl der durch H3K4me3 bzw. H3K27me3 markierten Gene.

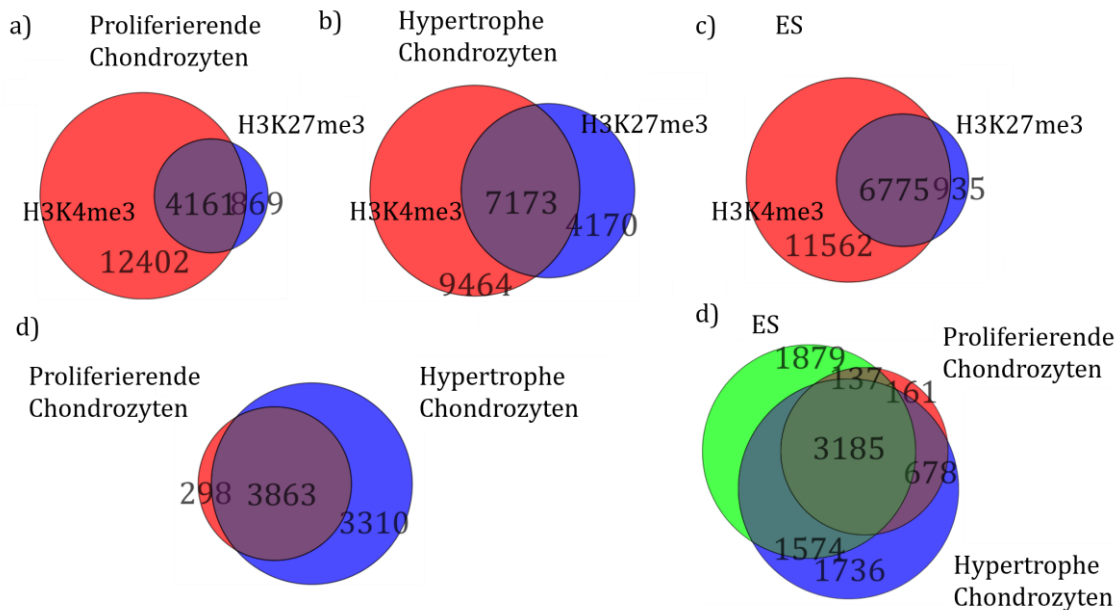


Abb. 31 Die höchste Anzahl an bivalenten Genen wurde in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen

Die Gene, welche durch H3K4me3- (rote Kreise a-c) und H3K27me3-Peaks (blaue Kreise a-c) markiert wurden, wurden in proliferierenden- (a), hypertrophen Chondrozyten (b) und in ES-Zellen miteinander verglichen. Die bivalenten Gene (violette Schnittmenge) (a-c) sind zwischen proliferierenden-(rot) und hypertrophen Chondrozyten (blau) (d) und zwischen allen drei Populationen verglichen worden (d; ES=grün).

Interessanterweise zeigte sich bei dieser Untersuchung, dass die hypertrophen Chondrozyten die höchste Anzahl an ausschließlich H3K27me3 markierten Genen (4.170) im Vergleich zu den proliferierenden Chondrozyten (869) und den ES-Zellen (935) aufwies (Abb. 31a-c). Dies zeigt eine Zunahme an Genen, welche nur durch H3K27me3, unabhängig von H3K4me3, im Verlauf der Chondrozytendifferenzierung reguliert werden. Dies bedeutet, dass die Hauptaufgabe der H3K27me3 Modifikation in ES-Zellen und proliferierenden Chondrozyten in der Regulation von bivalenten Genen liegt, diese jedoch im Laufe der hypertrophen Differenzierung ihre Funktion ändert.

In den proliferierenden Chondrozyten wurden weniger bivalente Gene (4.161) nachgewiesen als in den ES-Zellen (6.775) und in hypertrophen Chondrozyten (7.173)(Abb. 31a-c). Entgegen der Erwartung wurde in hypertrophen Chondrozyten die höchste Zahl an bivalenten Genen gefunden.

Beim Vergleich der bivalenten Gene beider Chondrozyten-Populationen, wurden 3.863 Gene detektiert, die in beiden Chondrozyten-Populationen reprimiert wurden. Zudem

wurden 3.185 dieser Gene auch in ES-Zellen als bivalent markiert gefunden (Abb. 31d, e). Die GO-Analyse dieser Gene zeigten signifikante Anreicherungen in Entwicklungs- und Differenzierungs-spezifischen Gruppen, wie z. B. der neuronalen Entwicklung. Dies könnte bedeuten, dass die Regulation von bivalenten Genen nicht nur zum schnellen An- und Abschalten von Genen benötigt wird, sondern auch eine Langzeitregulation darstellt.

4.3.3.2 Aktive Gene in proliferierenden Chondrozyten sind bivalent markiert in hypertrophen Chondrozyten

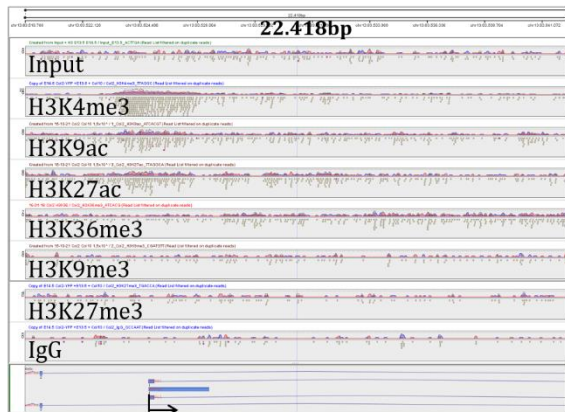
Neben den gemeinsamen, bivalent markierten Genen, konnten 298 bivalente Gene ausschließlich in proliferierenden Chondrozyten und 3.310 ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten identifiziert werden (Abb. 34d). Dabei könnte es sich um Gene handeln, die *geprimt* zur Transkriptions-Initiation vorliegen oder, wie für *Sox9* und *Acan* gezeigt wurde, die bereits transkribiert und abgeschaltet wurden. Ein Vergleich der bivalenten Gene mit den aktiven Genen, gemessen an dem Auftreten aller vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) sollte diese Möglichkeit überprüfen. Von den 298 bivalenten Genen der proliferierenden Chondrozyten wurden 107 Gene mit allen aktivierenden Histonmarkierungen in hypertrophen Chondrozyten gefunden. Die GO-Analyse dieser Gene zeigte keine Knorpel- oder Knochen-Terms, ebenso wenig wie Zellzyklus- oder Apoptose-Terms. Stattdessen traten verschiedene metabolische Prozesse auf.

Von den 3.310 bivalenten Genen der hypertrophen Chondrozyten sind 1.458 Gene in proliferierenden Chondrozyten aktiv. Bei diesen Genen handelte es sich nach GO-Analyse um Entwicklungs- und Skelett-spezifische Gene, wie „*Mesenchymal Cell Differentiation*“, „*Ossification*“ und „*Cartilage Development*“. In diesen GO-Terms fanden sich spezifische Gene der proliferierenden Chondrozyten, wie *Sox9* und *Col2a1*, zudem viele Gene, die an der Chondrozytendifferenzierung beteiligt sind, wie *Bmp2*, *Bmp7*, *Wnt5a*, *Mef2c*, *Ptch1*, *Gli1*, *Fgfr1*, 2 und *Fgfr3*. Das simultane Auftreten von H3K4me3 und H3K27me3, das bereits bei der Analyse der Chondrozyten-spezifischen Gene, *Sox9* und *Col2a1*, in hypertrophen Chondrozyten beobachtet wurde, konnte somit als generelles Prinzip zur Termination der Transkription identifiziert werden.

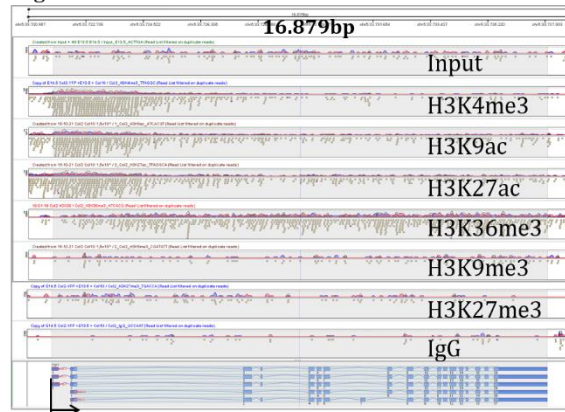
Um diese Hypothese zu überprüfen wurden zwei weitere Gene, der Transkriptionsfaktor *Mef2c* und der Rezeptor *Fgfr3*, analysiert.

a) Proliferierende Chondrozyten

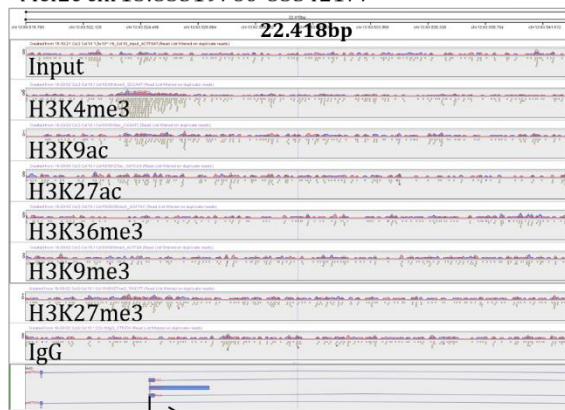
Mef2c chr13:83519760-83542177

**b) Proliferierende Chondrozyten**

Fgfr3 chr5:33720957-33737835

**c) Hypertrophe Chondrozyten**

Mef2c chr13:83519760-83542177

**d) Hypertrophe Chondrozyten**

Fgfr3 chr5:33720957-33737835

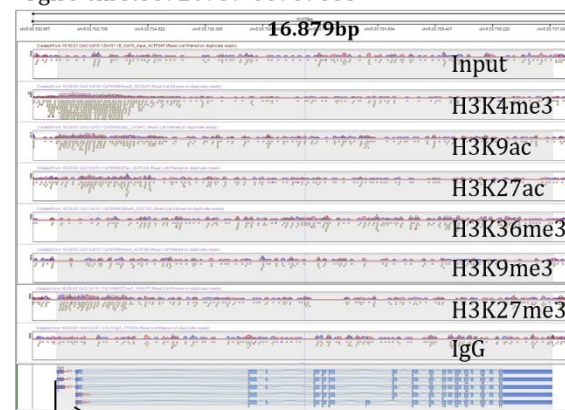


Abb. 32 H3K27me3 Modifikation reflektiert das Abschalten der Gene in hypertrophen Chondrozyten

Vergleich der beiden Gene *Mef2c* (a, c) und *Fgfr3* (b, d) in proliferierenden und (a, b), hypertrophen Chondrozyten (c, d). Das *Mef2c*-Gen ist auf Chromosom 13 lokalisiert (chr13:83.519.760-83.542.177), nur die Promotorsequenz von 22.418 bp ist mit der TSS (Pfeil) dargestellt. Zwei alternative Transkripte von *Mef2c* sind dort lokalisiert. Nur das 1. Exon (blauer Kasten) und das 1. Intron (blaue Linie) sind dargestellt. Das *Fgfr3*-Gen ist auf Chromosom 5 (chr5:33.720.957-33.737.835) lokalisiert, das gesamte Gen mit einem Bildausschnitt von 16.879 bp ist zu sehen. Hier befinden sich fünf alternative Transkripte mit zwei unterschiedlichen TSS. Der Pfeil markiert die erste TSS. Die ersten vier möglichen Transkripte entstehen aus 18 Exons, das fünfte aus 17 Exons.

Mef2c wird in der mesenchymalen Knorpelvorlage, sowie in proliferierenden und prähypertrophen Chondrozyten exprimiert, wohingegen es in hypertrophen Chondrozyten herunter reguliert wird (Arnold et al., 2007). In proliferierenden Chondrozyten zeigte *Mef2c* wie erwartet alle aktivierenden Histonmodifikationen eines transkriptionell-aktives Gens, während die Reprimierenden fehlten (Abb. 32a). In hypertrophen Chondrozyten wurden H3K4me3 und H3K27me3 Markierungen am

Mef2c-Gen gefunden (Abb. 32c), weiterhin wurden H3K9ac nachgewiesen, die anderen aktivierenden Histonmodifikationen fehlten. Diese Ergebnisse bestätigen das vermutete Muster zur Transkriptions-Termination. Dabei beschreiben die Histonmodifikations-Muster den genauen Expressionsverlauf. *Mef2c* wird in den proliferierenden Chondrozyten zur Expression aktiviert, dadurch führt es in prähypertrophen Chondrozyten zur Einleitung der Hypertrophie und wird im Verlauf der hypertrophen Differenzierung inhibiert.

Das *Fgfr3*-Gen ist ebenfalls in proliferierenden Chondrozyten aktiv und führt zur hypertrophen Differenzierung (Minina et al., 2002). In proliferierenden Chondrozyten zeigte das *Fgfr3*-Gen alle aktivierenden Markierungen (Abb. 32b). In hypertrophen Chondrozyten wurden ebenfalls alle vier aktivierenden Histonmodifikationen nachgewiesen, jedoch mit reduzierter Anreicherung und zusätzlich mit der reprimierenden H3K27me3-Markierung. Dieses Histonmodifikations-Muster könnte die Änderung der transkriptionellen Aktivität einleiten. Während die aktivierenden Histonmodifikationen am *Fgfr3*-Gen noch nicht ganz reduziert worden sind, wird die Transkription bereits durch H3K27me3 reprimiert.

Somit wird die Repression durch H3K27me3 aufrechterhalten, während die aktivierenden Modifikationen abgebaut werden.

Insgesamt konnten die Gene nach der Analyse der Histonmodifikationen in drei Gruppen eingeteilt werden:

- 1) Aktive Gene, die durch alle vier aktivierenden Histonmodifikationen markiert waren.
- 2) Bivalente Gene, die sowohl Anreicherungen von der aktivierenden H3K4me3- als auch der reprimierenden H3K27me3 Histonmodifikation aufwiesen.
- 3) Gene, die nicht markiert waren oder nur Anreicherungen einzelner Histonmodifikationen aufwiesen.

Zudem wurde durch die Untersuchung der Histonmodifikationen von bivalenten und Chondrozyten-spezifischen Genen (4.3.1) ein Muster zur Transkriptionsregulation entdeckt.

Zur Initiation der Transkription wurden zwei Histonmodifikations-Muster gefunden. Dabei waren Gene, die in proliferierenden Chondrozyten alle vier aktivierenden Histonmarkierungen trugen, in ES-Zellen entweder gar nicht markiert (z. B. *Runx2* und *Sox5*) oder sie lagen als bivalente Gene vor (*Sox9*, *Sox6*, *Gli3*, *Col2a1* und *Acan*). Dabei traten neben der bivalenten Gen-Markierung, H3K4me3 und H3K27me3, auch teilweise Markierungen von H3K9ac und H3K27ac auf, nur der Elongationsmarker H3K36me3 fehlte immer. Somit werden zur Initiation entweder nur die aktivierenden Histonmarkierungen angereichert oder die Gene werden zuerst durch H3K4me3 und H3K27me3 *geprimt*, woraufhin es zu einer Zunahme der aktivierenden Histonmodifikationen kommt. Als letzte Modifikation zur Aktivierung der Transkription wird immer H3K36me3 angereichert und ggf. die Repression durch H3K27me3 reduziert.

Zur Termination der Transkription wurde immer erst eine Repression durch H3K27me3 gefunden, bevor die aktivierenden Histonmodifikationen entfernt wurden, wie es am Beispiel von *Fgfr3* zu sehen ist. Zudem wurden die Anreicherungen der aktivierenden Markierungen stark reduziert. Zuerst wurde H3K36me3 reduziert (*Acan*), darauf folgt die H3K27ac Reduzierung (*Sox9*). Danach wurden die H3K9ac und H3K27me3 Markierungen entfernt, bis als letzte Markierung H3K4me3 zurück blieb (*Sox2*).

Somit scheint zur Termination der Transkription immer erst eine Anreicherung von H3K27me3 die Transkription zu beenden, bevor die aktivierenden Histonmodifikationen reduziert werden. Dabei wird H3K36me3 als erstes reduziert, darauf folgt H3K27ac, dann H3K9ac und H3K27me3, bis zum Schluss H3K4me3 entfernt wird.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die bivalente Markierung von Genen nicht nur ein typisches Merkmal von ES-Zellen ist, sondern ebenfalls einen wichtigen Regulationsmechanismus während der Differenzierung darstellt. Zu der bekannten Feinregulation durch die bivalente Markierung wurde ein Langzeit-Mechanismus entdeckt, der Entwicklungs-spezifische Gene dauerhaft reprimiert. Zudem wies die H3K27me3-Markierung auf eine zunehmende regulative Funktion, unabhängig von H3K4me3, im Verlauf der Differenzierung hin.

4.3.4 Genregulation durch Enhancer während der Zelldifferenzierung

Enhancer sind *cis*-regulierende Elemente, die mehrere kb von der TSS entfernt liegen können. Die Acetylierung von H3K27 durch p300 wird als Marker für aktive Enhancer außerhalb der Gensequenz verwendet. Das dazugehörigen Gen zeigt eine erhöhte transkriptionelle Aktivität, gemessen an der H3K9ac- oder H3K4me3-Anreicherung (Adam et al., 2015; Whyte et al., 2013).

4.3.4.1 Distanz der Enhancer zum Gen nimmt während der Differenzierung ab

Zur Enhancer-Detektion wurden H3K27ac-Anreicherungen analysiert, welche nicht an den TSS von Genen liegen. Hierfür wurden die H3K9ac-Reads, als Marker der TSS, von den H3K27ac-Reads abgezogen. Um auch weiter entfernte Enhancer entsprechenden Genen zuordnen zu können, wurde eine Distanz von 10.000 bp gewählt.

In proliferierenden Chondrozyten wurden 4.727 Peaks detektiert, welche 1.992 Genen zugeordnet werden konnten (Tab. 8). Die meisten Enhancer der proliferierenden Chondrozyten lagen in Introns (40,3 %) oder befanden sich *upstream* (18,1 %) des korrespondierenden Gens (Abb. 33a). 29,1 % der Enhancer konnten nicht eindeutig annotiert werden. Bei diesen Peaks handelt es sich um Enhancer, die mehr als 10.000 bp von ihrem korrespondierenden Gen entfernt liegen. In hypertrophen Chondrozyten wurden, mit 14.227 Enhancer-Peaks, dreimal so viele Enhancer detektiert wie in proliferierenden Chondrozyten. Diese 14.227 Enhancer konnten 10.016 Genen zugeordnet werden. In den hypertrophen Chondrozyten lagen der Großteil aller Enhancer in den *upstream* Regionen (33,7 %) oder in Introns (25,7 %) der Gene (Abb. 33b). Zusätzlich wurden, im Gegensatz zu den proliferierenden Chondrozyten, viele Enhancer in den 5'UTR und in kodierenden Exons detektiert. Nur 5,1 % der Enhancer wurden nicht annotiert und liegen in weiter entfernten Regionen.

In den ES-Zellen wurden 10.150 Enhancer detektiert, welche 2.793 Genen zugeordnet werden konnten. Damit wurden mehr Enhancer als in den proliferierenden Chondrozyten, aber deutlich weniger als in den hypertrophen Chondrozyten, detektiert. Die ES-Zellen zeigten mit 47,7 % den größten Anteil an nicht annotierbaren Peaks (Abb. 33c). Die annotierten Peaks hingegen hatten eine ähnliche Verteilung in Intron (30,9 %) und *upstream* Regionen (16,3 %) wie die Enhancer der proliferierenden Chondrozyten.

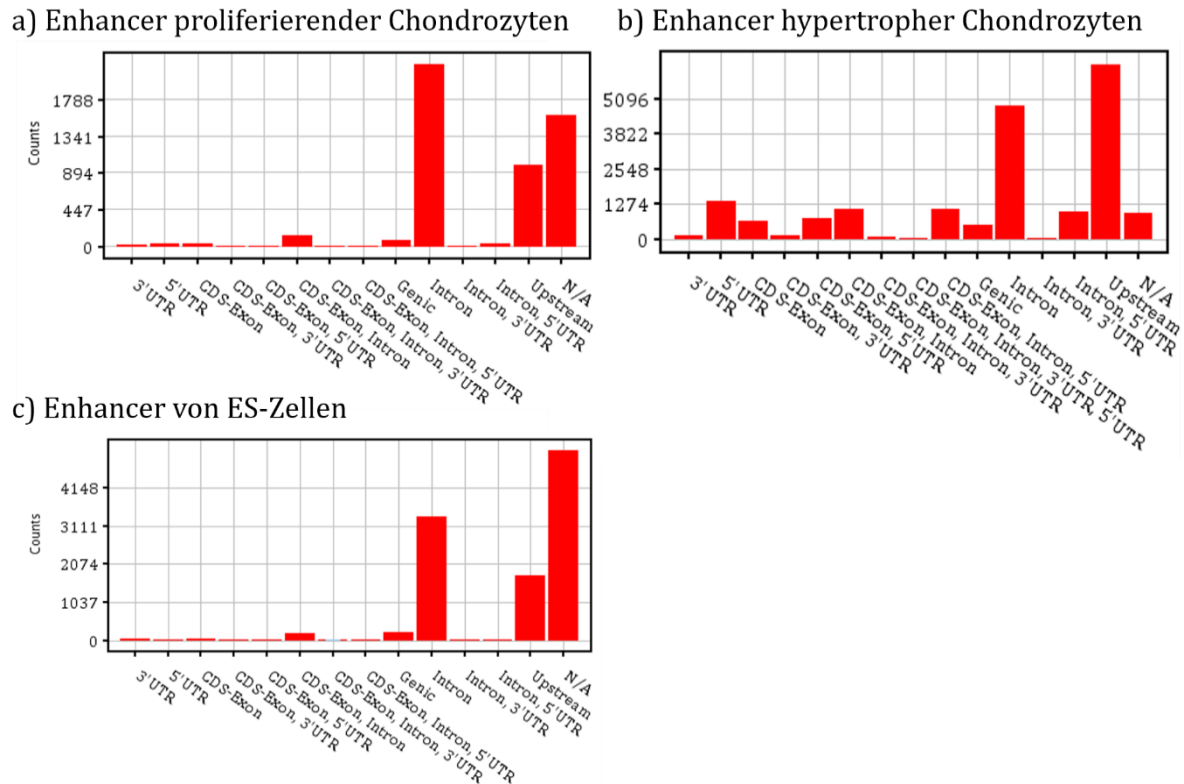


Abb. 33 Enhancerverteilung

Enhancer wurden durch Subtraktion der H3K9ac Reads von den H3K27ac Reads unter Verwendung des ERD ermittelt. Die Enhancer der proliferierenden Chondrozyten (a) befinden sich hauptsächlich in den Introns, weiter als 10.000 bp entfernt oder upstream der entsprechenden Gene. In hypertrophen Chondrozyten (b) wurden dreimal so viele Enhancer-Peaks detektiert wie in proliferierenden Chondrozyten. Die Enhancer befanden sich überwiegend in der *upstream* Region und weniger in den Intronregionen bzw. in der 5'UTR und in den kodierenden Exons (CDS-Exon= coding domain sequence Exon). Die ES-Zellen (c) zeigten die höchste Anzahl nicht annotierbarer Peaks. H3K27ac-Peaks die weiter als 10 kb von einem Gen entfernt lagen wurden keinem Gen zugeordnet (N/A= no annotation). Die Grafik beinhaltet die H3K27ac-Peaks und ihre Lokalisation zu allen im Umkreis von 10 kb gelegenen Genen. Dabei können mehrere Genlokalisierungen pro Peak detektiert worden sein. Mehrere Peaks im gleichen Gen werden dabei mehrfach gelistet.

Insgesamt konnten in hypertrophen Chondrozyten die meisten Enhancer nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Enhancer-Lokalisationen aller drei Zelltypen wurde nicht nur eine veränderte Lage, sondern auch eine veränderte Distanz zum Gen identifiziert. Die Anzahl der nicht annotierbaren Enhancer, die mehr als 10.000 bp vom nächsten Gen entfernt lagen, wurden von ES-Zellen (47,7 %) und proliferierenden Chondrozyten (29,1 %) bis hin zu hypertrophen Chondrozyten (5,1 %) stark reduziert. Dies lässt auf eine Abnahme der Distanzen zwischen Enhancer und Gen im Verlauf der Differenzierung schließen.

4.3.4.2 Vergleich der Enhancer mit H3K9ac-positiven TSS

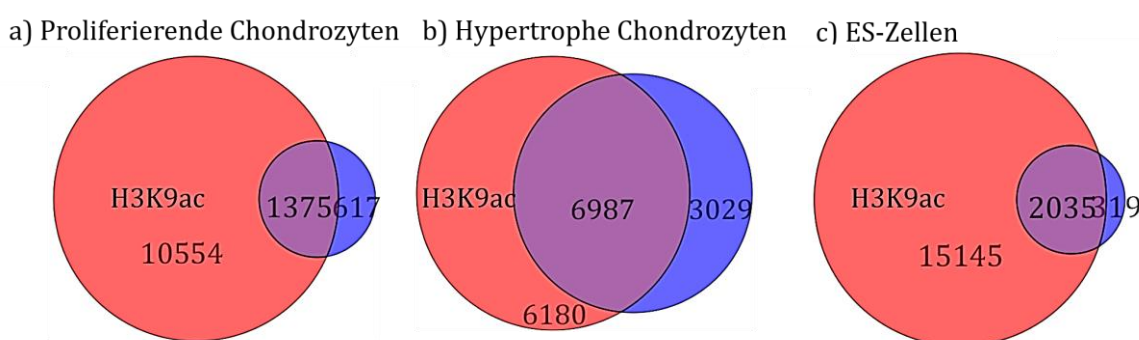
Um Enhancern potentiell-aktiven Genen zuordnen zu können, werden sie zum nächstliegenden Gen in 10 kb annotiert und mit H3K9ac markierten Genen verglichen (Tab. 8; Abb. 34) (Adam et al., 2015; Whyte et al., 2013). Damit soll die Verbindung zwischen dem Enhancer und reguliertem Promotor analysiert werden.

Von den 2.793 annotierten Genen in ES-Zellen wiesen 2.306 (83 %) eine Markierung durch H3K9ac auf (Abb. 34c). In proliferierenden Chondrozyten konnten 69 % der annotierbaren Enhancer potentiell-aktiven Genen (1.375) zugeordnet werden. Ebenfalls wurden in hypertrophen Chondrozyten 70 % der annotierbaren Enhancer potentiell-aktiven Genen (6.987) zugewiesen. Dies zeigt, dass der Großteil der nahe gelegenen Enhancer zur potentiellen Aktivität des korrespondierenden Gens führt.

	Peaks	Annotierte Gene	Potentiell-aktive Gene	Relativ zu den annotierten Genen
Proliferierende C.	4.727	1.992	1.375	69%
Hypertrophe C.	14.227	10.016	6.987	70%
ES-Zellen	10.150	2.793	2.035	83%

Tab. 8 Enhancer-Detektion durch H3K27ac

Enhancer-Peak-Detektion durch Abzug der H3K9ac von H3K27ac-Reads und Annotation der nächstliegenden Gene im Bereich von 10.000 bp. Die potentielle Aktivität der Gene wurde durch die H3K9ac Markierung am korrespondierenden Gen nachgewiesen.



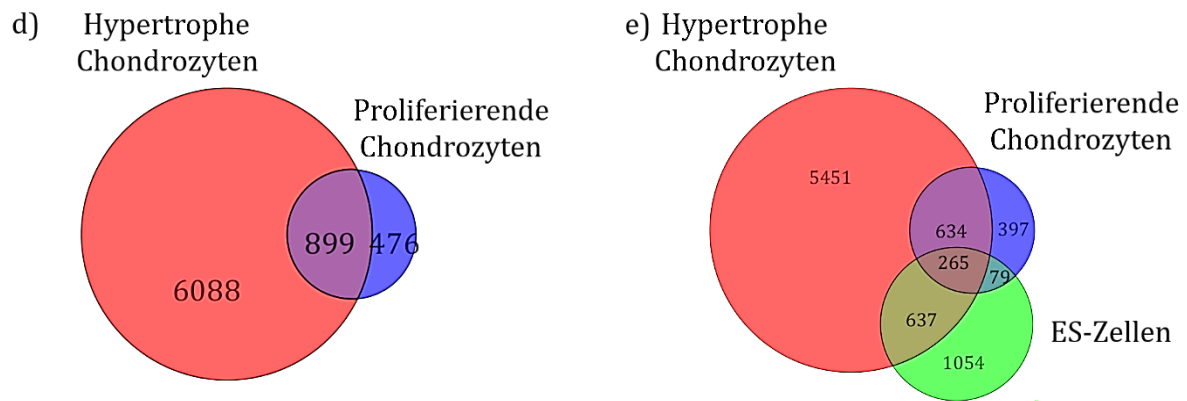


Abb. 34 In hypertrophen Chondrozyten wurde die höchste Anzahl an potentiell-aktiven Genen durch Enhancer reguliert

Die durch H3K9ac Markierung als potentiell-aktiv identifizierte Gene (rot: a, b, c) wurden mit den durch Enhancer annotierten Genen (blau: a, b, c) von proliferierenden- (a), hypertrophen (b) Chondrozyten und ES-Zellen (c) verglichen. Vergleich der potentiell-aktiven Gene beider Chondrozyten-Populationen (d) und aller Zelltypen (e).

Der Vergleich potentiell-aktiver Gene in den drei Zelltypen zeigte, dass die proliferierenden Chondrozyten mehr Gemeinsamkeiten mit ES-Zellen und hypertrophen Chondrozyten hatten, als ES Zellen und hypertrophe Chondrozyten untereinander. Grundsätzlich waren die Populationen jedoch recht verschieden (Abb. 34e).

Interessanterweise wiesen die proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten 899 gemeinsame potentiell-aktive Gene auf (Abb. 34d). Beim direkten Vergleich der Enhancer-Peaks von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten gab es nur 202 überlappende Enhancerregionen, die zu 163 Genen annotiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass zwischen den beiden nahe verwandten Zelltypen unterschiedliche Enhancersequenzen für die Aktivierung der gleichen Gene verwendet werden.

Die 899 Gene, die über Enhancer in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten reguliert wurden, wiesen signifikante GO-Terms von entwicklungsbiologischen und skelettalen Prozessen auf. In diesen Untergruppen wurden Chondrozyten-spezifische und Differenzierungs-spezifische Gene, wie *Sox9*, *Sox5*, *Sox6* und *Runx2*, aber auch weitere Transkriptionsfaktoren, wie *Mef2c*, *Gli2*, *Runx1* und spezifische EZM-Moleküle (*Acan*, *Col1a1*, *Col2a1*, *Col11a1*) und EZM-abbauende Enzyme (*Mmp2*), sowie Bmp- (*Bmp7*, *Bmpr1b*), Fgf- (*Fgf2*, *Fgfr1*) und Wnt-Signalwegskomponenten (*Wnt5a*) detektiert (Alle Genlisten befinden sich im Anhang auf DVD).

Somit werden Chondrozyten-spezifische Gene in beiden Chondrozyten-Populationen durch unterschiedliche, Zelltyp-spezifische Enhancer, reguliert.

Interessanterweise wurden auch Enhancer für Gene identifiziert, die bereits nicht mehr transkriptionell-aktiv waren. In hypertrophen Chondrozyten wurden beispielsweise Enhancer für *Mef2c*, *Sox9*, *Sox5*, *Sox6* und *Runx2* detektiert, obwohl diese bereits durch H3K27me3 reprimiert wurden und/oder die aktivierenden Histonmodifikationen teilweise reduziert waren.

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass das Enhancer-Element weiterhin mit der Promotorregion interagiert und nach wie vor durch H3K27ac markiert wird, ähnlich, wie an der TSS nach Transkriptionsende nicht alle aktivierenden Histonmodifikationen direkt abgebaut wurden.

Insgesamt zeigt sich bei dieser Untersuchung, dass nicht nur aktive Enhancer identifiziert werden können, sondern auch Enhancer, deren Gene nicht mehr transkribiert werden. Somit konnte festgestellt werden, dass Enhancer auch nach beendeter Transkription ihre aktivierende Markierung behalten können. Zudem konnte belegt werden, dass bestimmte Chondrozyten-spezifische Gene über verschiedene Enhancer-Elemente in proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten reguliert werden.

4.3.4.3 Vergleich der Enhancer mit transkriptionell-aktiven Genen

Durch den Vergleich der Enhancer mit durch H3K9ac markierten Genen konnten die Enhancer bestimmten Genen zugeordnet werden, ob das Gen tatsächlich als transkriptionell-aktiv markiert ist, kann nur durch das Vorhandensein aller vier aktivierenden Histonmodifikationen bestätigt werden.

In ES-Zellen konnten nur 2.035 potentiell-aktive Gene den 10.150 Enhancern zugeordnet werden, insgesamt trugen jedoch 10.802 Gene alle vier aktivierenden Histonmodifikationen. Dieses könnte darauf hindeuten, dass jedes aktive Gen über einen eigenen Enhancer aktiviert wird, aber weiter als 10 kb vom regulierten Gen entfernt liegen. In proliferierenden Chondrozyten wurden nur 4.727 Enhancer ermittelt, obwohl 7.924 Gene aktivierende Markierungen trugen. Dies könnte entweder bedeuten, dass ein Enhancer mehrere Gene reguliert oder viele TSS-nahe Enhancer durch den Abzug der H3K9ac Reads nicht gefunden wurden. Die Anzahl der aktiven Gene war in hypertrophen Chondrozyten mit 8.261 Genen leicht höher als in proliferierenden Chondrozyten, zusätzlich wurden mit einer Anzahl von 14.227 sehr viel mehr Enhancer identifiziert als in den anderen Zelltypen. Somit könnten in hypertrophen Chondrozyten mehrere

Enhancer benötigt werden, um ein Gen zu regulieren. Da die Entfernung zwischen Enhancer und Gen im Verlauf der Differenzierung abnahm, ist es möglich, dass die proximalen Enhancer eine geringere Aktivität aufweisen und daher mehrere Regionen zur Aktivierung eines Gens benötigt werden.

Um herauszufinden, welche Enhancer aktiv-transkribierten Genen zugeordnet werden können, wurden alle Gene, die durch Enhancer annotiert wurden, mit den aktiven Genen, gemessen am Auftreten aller vier aktivierenden Histonmodifikationen verglichen (Abb. 35).

Von den 1.375 potentiell-aktiven Genen in proliferierenden Chondrozyten waren 1.027 (75 %) als aktiv markiert. Davon wurden 196 Gene ausschließlich in proliferierenden und nicht in hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Die GO-Analyse wies signifikante Anreicherungen von Genen in Chondrozyten-spezifische Terms, wie „*Cartilage Development*“, „*Chondrocyte Differentiation*“, „*Collagen*“ und „*Skeletal System Development*“ nach. In hypertrophen Chondrozyten waren 3.840 Gene (55 %), der 6.987 potentiell-aktiven Gene, aktiviert (Abb. 35). Davon wurden 830 Gene ausschließlich in hypertrophen Chondrozyten exprimiert, die hauptsächlich in GO-Terms von metabolischen und mitochondrialen Prozessen eingeordnet wurden.

a) Enhancer proliferierender Chondrozyten b) Enhancer hypertropher Chondrozyten

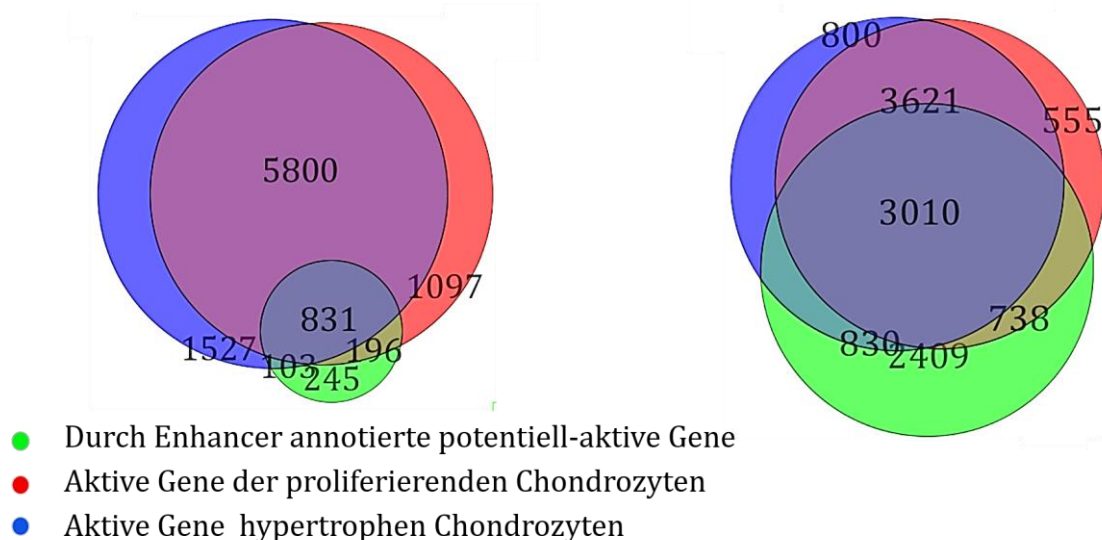


Abb. 35 Die Enhancer-Markierung kann bereits vor und nach transkriptioneller-Aktivität vorhanden sein

Die Gene, die durch Enhancer (grün) der proliferierenden (a) und hypertrophen Chondrozyten (b) annotiert wurden, wurden auf ihre Aktivität in beiden Populationen hin untersucht. Dabei wurden die

aktiven Gene, gekennzeichnet durch alle vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) der proliferierenden (rot)- und hypertrophen Chondrozyten (blau) verglichen.

Die Enhancer der proliferierenden Chondrozyten regulierten 831 Gene, die in beiden Chondrozyten Populationen aktiv waren (Abb. 35a). Diese Gene wurden in Skelett-spezifische GO-Terms unterteilt, wie „*Anatomical Structure Development*“, und „*Cartilage Development*“, aber auch in Zellzyklus-spezifischen Terms, wie „*Cell Cycle*“ und „*Cell Proliferation*“. In den GO-Terms, der 3.010 gemeinsamen Gene, die durch Enhancer der hypertrophen Chondrozyten gefunden wurden, waren ebenfalls Zellzyklus-spezifische, jedoch keine Skelett-spezifischen Terms vorhanden (Abb. 35b).

Interessanterweise wurden von den 1.375 potentiell-aktiven Enhancern in proliferierenden Chondrozyten, 103 Gene identifiziert, die nur in hypertrophen und nicht in proliferierenden Chondrozyten aktiv waren (Abb. 35a). Dies deutet daraufhin, dass die Enhancer bereits in proliferierenden Chondrozyten markiert werden, aber erst in hypertrophen Chondrozyten das korrespondierende Gen aktivieren. Möglicherweise wird die H3K27ac Markierung, ähnlich wie bei der Transkriptions-Initiation an der TSS, bereits angereichert, aber es fehlen noch weitere Faktoren, wie z. B. Transkriptionsfaktoren, um die Transkription zu aktivieren.

Mittels GO-Analyse zeigten diese 103 Gene bei einem Signifikanzniveau $<0,05$ keine signifikanten Anreicherungen in GO-Terms.

Ebenso wurden in hypertrophen Chondrozyten 738 durch Enhancer regulierte Gene nachgewiesen, die nur in proliferierenden und nicht in hypertrophen Chondrozyten aktiviert wurden. Dies weist daraufhin, dass nach beendeter Transkription die Verbindung von Promoter und Enhancer noch nicht gelöst ist und die aktivierenden Histonmodifikationen noch nicht entfernt worden sind.

Die GO-Analyse der 738 Gene, die nur in proliferierenden Chondrozyten aktiv sind, wurden hauptsächlich in Terms der Skelettentwicklung, wie „*Skeletal System Development*“, „*Mesenchymal Cell Differentiation*“, „*Collagen Fibrill Organisation*“ und „*Ossifikation*“ eingeteilt. Darunter wurden die Chondrozyten-spezifischen Marker, wie *Sox9*, *Col2a1*, *Acan* und *Mef2c* entdeckt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Zelltyp-spezifischen Enhancer bereits vor aktivierter- und auch nach beendeter Transkription durch H3K27ac markiert sind. Somit markiert H3K27ac nicht nur aktive Enhancer.

4.3.5 Enhancer-Analyse durch Sox9

Sox9 ist ein Transkriptions-Aktivator und essentiell für die Chondrozytendifferenzierung. Neben der Bindung an Promotoren, bindet Sox9 hauptsächlich an Enhancerregionen (Liu und Lefebvre, 2015). Zur Bestätigung der aktiven Enhancer in Chondrozyten wurden zusätzlich bereits publizierte Daten eines Sox9 und RNA-Pol II S5 ChIP-seqs von Chondrozyten (Ohba et al., 2015) mit den hier identifizierten Enhancern verglichen.

4.3.5.1 Mehr Sox9-spezifische Enhancer in proliferierenden Chondrozyten als in hypertrophen Chondrozyten

Die Daten des Sox9 und RNA-Pol II-ChIP-seq wurden aus Rippen-Chondrozyten von einen Tag alten Mäusen (P1) generiert. Diese Zellen stellen eine gemischte Population aus proliferierenden- und prähypertrophen Chondrozyten dar (Ohba et al., 2015). Die Reads der ChIP-seq Daten waren teilweise sehr kurz und von unterschiedlicher Länge (Sox9=51 bp, RNA-Pol II S5=29 bp, IgG=38 bp). Die Rohdaten wurden entsprechend ihrer verkürzten Read-Länge mit den Settings der Chondrozyten aligniert und bearbeitet. Die Peak-Detektion wurde mit MACS vorgenommen, da es sich um schmale, hohe Peaks eines Transkriptionsfaktors bzw. der RNA-Pol II handelt. Bei der Peak-Detektion wurde die IgG-Kontrolle nicht vom Datensatz abgezogen, da diese aus einem anderen Experiment stammte. Die Sox9- und RNA-Pol II S5 ChIP-seq-Daten zeigten mit 35 bzw. 27 Mio. eine hohe Anzahl an Reads (Tab. 9). Nach dem Alignment, der metrischer Bearbeitung und nach Abzug der Duplikate konnten noch 58 % der Reads für Sox9 (20,6 Mio.) und für die RNA-Pol II S5 (15,6 Mio.) zur Peak-Detektion herangezogen werden. Mittels MACS-Algorithmus wurden für Sox9 51.088 Peaks und damit 16.019 Gene annotiert. Für die RNA-Pol II S5, welche die Initiation der Transkription markiert, wurden 19.376 Peaks gefunden, welche 13.933 Gene markierten.

Sox9	Rohreads	Unique	Metrisch	Duplikate	Reads	MACS	Gene
		%	%	%			
Sox9	35.167.852	76,20%	67,704	58,69	20.641.504	51.088	16.019
RNA-Pol II S5	26.799.385	72,70%	69,83	58,28	15.619.174	19.376	13.933
IgG	31.988.311	65,60%	58,74	21,85	6.989.608		

Tab. 9 Alignment und Peak-Detektion der Sox9 und RNA-Pol II S5 Sequenzdaten mittels StrandNGS

Die Rohdaten der Sequenzierung wurden von GEO NCBI geladen (Ohba et al., 2015), mittels StrandNGS bearbeitet und gegen das Mausgenom mm10 aligniert. Die Peak-Detektion wurde mit MACS vorgenommen.

Um Chondrozyten-spezifische Enhancer zu analysieren, wurden die Peakregionen von Sox9 mit den in dieser Arbeit ermittelten Enhancern verglichen. Mit dieser Auswertung überlappen von den 51.088 Sox9 Peaks 665 Enhancer-Regionen in proliferierenden- und 2.579 Enhancer in hypertrophen Chondrozyten (Tab. 10). Um diesen Enhancern eine Aktivität am korrespondierenden Gen zuweisen zu können, wurden sie mit den aktiven Genen, gemessen an dem Vorhandensein aller vier aktivierenden Histonmodifikationen, und der RNA-Pol II S5 (Ohba et al., 2015) verglichen (Abb. 36). In proliferierenden Chondrozyten wurden den 665 Sox9-bindenden Enhancern 412 Gene zugeordnet, davon zeigten 227 Gene anhand der aktivierenden Histonmodifikationen und der RNA Pol II S5 eine transkriptionelle Aktivität (Abb. 36a, Tab. 10). Die 2.579 Enhancerregionen in den hypertrophen Chondrozyten konnten 2.478 Genen zugeordnet werden, wobei 1.206 dieser Gene als aktiv markiert waren (Abb. 36b). Damit zeigten die Enhancer der hypertrophen Chondrozyten unerwarteterweise eine höhere Übereinstimmung mit den Sox9-Peaks, als die der proliferierenden Chondrozyten. Beim Vergleich der Enhancerregionen untereinander zeigte sich, dass nur 32 Enhancerregionen identisch in beiden Populationen waren (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse stimmen mit den oben beschriebenen Unterschieden in den verwendeten Enhancern zwischen proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten überein. Der Vergleich der aktiven Gene untereinander offenbarte, dass 42 Gene in beiden Zelltypen durch Sox9 reguliert werden (Abb. 36c). Diese 42 Gene könnten mit einem Signifikanzniveau von $<0,05$ keinen GO-Terms zugeordnet werden. Die 185 Gene der proliferierenden Chondrozyten, die durch Sox9 regulierte Enhancer aktiviert wurden enthielten Skelett-spezifische GO-Terms, wie „*Anatomical Structure Development*“, „*Cell Differentiation*“ und „*Skeletal System Development*“. Interessanterweise zeigten die Sox9-Enhancer der hypertrophen Chondrozyten Gen-Anreicherungen in den GO-Terms: „*Cell Cycle*“ und „*Cell Death*“. Darunter befanden sich die Gene der Zellzyklus Inhibitoren *p21* und *p27*, sowie das proapoptotische Gen *Bad*.

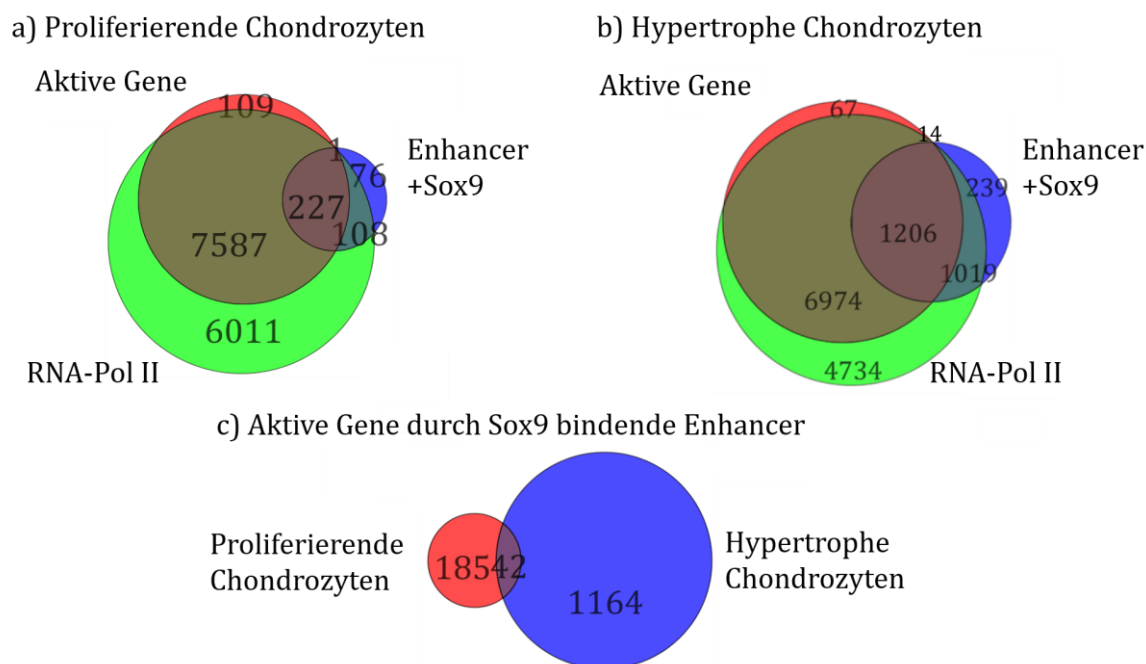


Abb. 36 Vergleich der Sox9-bindenden Enhancer

Die Enhancerregionen, analysiert durch H3K27ac-H3K9ac, wurden mit den Sox9-Peaks verglichen. Die spezifischen Sox9 Enhancerregionen von proliferierenden (a) und hypertrophen (b) Chondrozyten wurden den nächstliegenden Genen innerhalb von 10 kb zugeordnet (blauer Kreis= Enhancer+Sox9). Diese Gene wurden zur Aktivitätsbestimmung mit allen aktiven Genen, gemessen an allen vier aktivierenden Histonmodifikationen (roter Kreis) und die RNA-Pol II S5 (Ohba et al., 2015)(grüner Kreis), verglichen. (c) Alle Sox9-spezifischen Gene von proliferierenden- (roter Kreis) und hypertrophen Chondrozyten (blauer Kreis) mit transkriptioneller Aktivität wurden miteinander verglichen.

	Sox9-spezifische Regionen	Annotierte Gene	Aktive Gene
Proliferierende C.	665	412	227
Hypertrophe C.	2579	2478	1206

Tab. 10 Sox9-spezifischer Enhancer

Enhancer-Peaks (H3K27ac-H3K9ac) wurden mit den Sox9-Bindestellen verrechnet und die identischen Regionen dem nächsten Gen zugeordnet (10.000 bp). Die Aktivität dieser Gene wurde durch den Vergleich aller vier aktivierenden Histonmodifikationen und mit RNA-Pol II S5 markierten Genen analysiert (Aktive Gene).

Insgesamt zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Sox9 Bindestelle mit den hier identifizierten Enhancern in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten. Da die Sox9-Bindestellen aus einer gemischten Population proliferierender und prähypertropher Chondrozyten identifiziert wurden, müssten die Sox9-regulierten

Enhancer der hypertrophen Chondrozyten durch ein Sox9-ChIP in diesen Zellen nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Im Verlauf der endochondralen Ossifikation entsteht durch die Chondrozytendifferenzierung die Wachstumsfuge, die zum einen zur Bildung des axialen- und appendikularen Skeletts durch Knochen ersetzt wird, und zum anderen den Knorpel der Gelenke bildet. Dieser Prozess ist abhängig von der koordinierten Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten. Defekte in der Chondrozytendifferenzierung können zu schwerwiegenden skelettalen Dysplasien führen.

Die enchondrale Ossifikation wurde bereits durch zahlreiche Publikationen auf Gen-, m-RNA und Proteinebene untersucht, wodurch die Regulation und die Funktion vieler essentieller Signalwege aufgeklärt werden konnte. Aber erst vor kurzem wurde entdeckt, dass Histon-modifizierende Enzyme eine entscheidende Rolle bei der Chondrozytendifferenzierung spielen. Bis jetzt wurde jedoch noch nicht versucht, die molekularen Mechanismen der Regulation durch Histonmodifikationen zu entschlüsseln. Ziel dieser Arbeit war eine systematische Analyse der Histonmodifikationen während der Chondrozytendifferenzierung, um die Änderung epigenetischer Markierungen mit dem transkriptionellen Read-out bekannter Regulatoren der Chondrozytendifferenzierung zu korrelieren.

5.1 Die ChIP-seq Methode und Auswertung der Rohdaten

Die Chromatin-Immunopräzipitation mit anschließendem *Next Generation Sequencing* hat sich in den letzten Jahren als essentielle Methode bewährt, um DNA-Protein-Bindungen zu analysieren. Der enorme Fortschritt in der NGS-Technologie ermöglicht eine hohe Auflösung der Daten, wenig Hintergrundrauschen und eine hohe *Coverage* im Gegensatz zu Array-basierten Daten. Mit abnehmenden Kosten der ChIP-seq Methode wurde diese Technologie unverzichtbar für die Untersuchung der Genregulation durch epigenetische Mechanismen.

5.1.1 Etablierung eines ChIP-seq-Protokolls für geringe Zellzahlen

Die Schwierigkeit bei der Verwendung der ChIP-Methode im Rahmen dieser Arbeit, lag in der Gewinnung einer ausreichend hohen Anzahl an hypertrophen Chondrozyten. Der

Anteil an hypertrophen Chondrozyten in E14.5-E15.5 Embryonen ist mit 0,1-1,3 % sehr gering, wodurch mittels FACS lediglich zwischen 10.000 und 40.000 hypertrophe Chondrozyten gewonnen werden können. Da übliche ChIP-Protokolle jedoch 1×10^7 - 1×10^8 Zellen pro Antikörper verwenden (Adam et al., 2015; Ohba et al., 2015; Whyte et al., 2013), hätte dies über 200 Embryonen pro ChIP-Präzipitation erfordert. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein ChIP-Protokoll etabliert, das es ermöglicht, aussagekräftige ChIP-seq Daten aus nur $3,5 \times 10^5$ Zellen zu generieren.

Zur Etablierung eines ChIP-seq-Protokolls sind die wichtigsten und sensibelsten Punkte die Wahl der spezifischen Antikörper, die Häufigkeit des zu präzipitierenden Proteins, sowie die Fixierung und Fragmentierung des Chromatins.

5.1.1.1 Einfluss des Antikörpers auf die Qualität der ChIP-seq Daten

Zur Analyse der Histonmodifikationen wurden Antikörper gegen verschiedene Histonmodifikationen getestet, die alle wichtigen Aspekte der Genregulation umfassen. Zusätzlich wurden Antikörper gegen die RNA-Pol II, zum Nachweis der Genexpression und gegen die HAT p300, die Enhancer markiert, getestet (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse der Transkription und der Enhancer sollten Antikörper gegen die RNA-Pol II und die Hat p300 mit Antikörpern der Firma Abcam etabliert werden. Es wurden RNA-Pol II Antikörper gegen drei verschiedene Epitope geprüft: RNA-Pol II S2 (Phosphorylierung an Serin 2), RNA-Pol II S5 (Phosphorylierung an Serin 5) und RNA-Pol II CTD (*C-terminal domain*). Die Phosphorylierung von S5 der RNA-Pol II dient zur Initiation der Transkription, während die Phosphorylierung an S2 zur Elongation der Transkripte benötigt wird. Der Antikörper, welcher gegen die RNA-Pol II CTD gerichtet ist, sollte beide modifizierten RNA-Polymerasen identifizieren.

Durch die geringe Anzahl an hypertrophen Chondrozyten wurde die Zellzahl für die ChIP-Präzipitation jedoch so stark reduziert, dass keiner der oben genannten Antikörper Ergebnisse erzielte, die mit anderen Publikationen vergleichbar waren. Auch eine Erhöhung der Zellzahl auf bis zu 7×10^7 Zellen pro ChIP führte nicht zu der gewünschten Steigerung der Peaks. Mit 1×10^8 Zellen pro ChIP konnte im embryonalen Stammzell-ChIP von Mikkelsen (M-ChIP) ebenfalls keine erfolgreiche Präzipitation der RNA-Polymerase nachgewiesen werden (Mikkelsen et al., 2007). In der bereits publizierten Studie wurde zum Nachweis der RNA-Polymerase ebenfalls der RNA-Pol II S5 (Abcam)-Antikörper verwendet (Ohba et al., 2015). Dabei wurde mit 1×10^8 Zellen pro ChIP eine große Anzahl an Peaks gefunden. Da eine solch hohe Zellzahl für hypertrophe Chondrozyten nicht

realisierbar ist, wurde der H3K36me3-Antikörper als Readout der RNA-Polymerase verwendet. Der Vergleich der H3K36me3-Daten von proliferierenden Chondrozyten mit publizierten Daten für die RNA-Polymerase (Ohba et al., 2015) zeigte dabei eine hohe Übereinstimmungen (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss des Antikörpers auf die Qualität der ChIP-seq Daten ist am Beispiel des H3K27ac-Antikörpers erkennbar. Nach der Immunopräzipitation mit dem kommerziell erhältlichen H3K27ac-Antikörper der Firma Diagenode konnten nur rund 6.000 Peaks nachgewiesen werden. Diese Anzahl war im Verhältnis zu publizierten Daten zu gering, daher wurde der H3K27ac-Antikörper der Firma Abcam getestet, dessen Funktion bereits in Publikationen bestätigt wurde (Ohba et al., 2015). Mit Hilfe dieses H3K27ac-Antikörpers konnten reproduzierbar rund 25.000 Peaks identifiziert werden. Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der oben genannte Antikörper für alle weiteren Experimente verwendet.

5.1.1.2 Die Fixierung und Fragmentierung des Chromatins sind entscheidend für die Qualität der Daten

Ein weiterer entscheidender Schritt zur Erhöhung der Spezifität der ChIP-Methode ist die Quervernetzung der Histone mit der DNA und die anschließende Chromatin-Fragmentierung. Ist die Fixierung zu gering binden die Proteine nicht stark genug an die DNA und es wird nicht ausreichend Material präzipitiert. Ist wiederum die Fixierung zu stark, besteht die Möglichkeit einer extremen Vernetzung der Proteine, wobei nicht nur die DNA-bindenden Proteine, sondern auch die Chromosomen untereinander fixiert werden können. Somit kommt es zu unspezifischen Präzipitationen. Darüber hinaus erschwert eine zu lange Fixierung die Fragmentierung und verhindert so die Isolation der einzelnen Chromatin-Fragmente. Da die Zellen eine unterschiedliche Sensitivität bezüglich der Fixierung aufweisen, ist es notwendig, die Fixierungszeiten für jeden Zelltyp zu ermitteln.

Einen weiteren wichtigen Punkt neben der Fixierung stellt die Größe der DNA-Fragmente dar. Optimale Resultate, zur späteren Lokalisation der Histonmodifikationen auf dem Genom, werden bei Fragment-Größen zwischen 200-600 bp erreicht (Abb. 6). Sind die Fragmente zu groß, kann die Lage der Reads von der tatsächlichen Lage der Histone abweichen. Sind sie jedoch zu klein, ist eine Library-Präparation zur Sequenzierung nicht mehr möglich. Die Probleme bei der Fragmentierung des Chromatins treten durch den unterschiedlichen Kondensierungsgrad des Hetero- und Euchromatins auf. Das

Euchromatin wird durch die leicht zugängliche DNA schnell fragmentiert, während beim stark kondensierten Heterochromatin größere Fragmente zurückbleiben (Teytelman et al., 2009). Deshalb muss jede Fragmentierung vor der Immunopräzipitation analysiert werden, um die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der ChIP-seq Daten zu gewährleisten.

Es gibt viele Methoden zur Fragmentierung des Chromatins. Beispielfhaft können hier die Ultraschallbehandlung, die Nebulisation, der DNaseI-Verdau, die enzymatische Spaltung durch Nukleasen und eine, auf einer Transposase-basierende Reaktion genannt werden. Letztere fügt während der Fragmentierung die Adapter zur Sequenzierung ein (Nextera). In dieser Arbeit wurde die Fragmentierung mittels Ultraschallbehandlung und enzymatischem Verdau durch eine Micrococcal Nuclease (New England Biolabs) getestet (Daten nicht gezeigt). Diese Nuklease führte in HEK (Human Embryonic Kidney)-Zellen zu reproduzierbaren Ergebnissen. In Chondrozyten konnten jedoch die gewünschten Fragmentgrößen nicht erreicht werden. Die Ultraschallbehandlung hingegen ermöglichte die Anreicherung von Fragmentgrößen zwischen 200 und 600 bp. Nur die Marker des Heterochromatins H3K9me3 und H3K27me3 zeigten nach Immunopräzipitation eine eindeutige Verschiebung der Fragment-Größen bis zu um 2.000 bp. Der Grund hierfür ist das Heterochromatin, das nur schwer fragmentierbar ist. Um mit diesen großen Fragmenten eine Library zu synthetisieren, wird in der Publikation von Mokry vorgeschlagen, nach erfolgter Immunpräzipitation und *Decrosslinking*, die DNA-Fragmente ein weiteres Mal zu fragmentieren (Mokry et al., 2010). Dies führt jedoch zu falsch positiven Ergebnissen, da ein präzipitiertes Fragment durch Aufspaltung in viele kleine Fragmente zusätzliche Reads produzieren würde. Deshalb wurde auf eine weitere Fragmentierung in dieser Arbeit verzichtet.

5.1.1.3 Die Amplifikation zur Library-Präparation kann zur Verschiebung des Probenpools führen

Ein Schlüsselement für das *Next Generation Sequencing* ist die Herstellung der Library, wobei jedes Fragment zur späteren *Bridgeamplification* und Zuordnung zur jeweiligen Histonmodifikation mit einem Adapter und einem Barcode versehen wird. Es ist bekannt, dass die zur Herstellung der Library notwendige Amplifikation mittels PCR die Probenkomposition leicht verzerrt, da nicht alle Fragmente mit der gleichen Effizienz amplifiziert werden. Fragmente mit ausgeglichenem GC-Gehalt werden effizienter amplifiziert als GC- oder AT-reiche Fragmente (Day et al., 1996). Um dieses Problem zu

umgehen, gibt es mittlerweile Protokolle zur Library-Präparation, die ganz auf eine Amplifikation verzichten. Diese Protokolle sind nur bei dem Vorhandensein von ausreichendem Startmaterial möglich (Kozarewa et al., 2009). Durch die hier verwendeten geringen Zellzahlen sind die Amplifikationsschritte unumgänglich und dienen der späteren robusten Read-Detektion im Genom (Metzker, 2010). Somit ist das Ziel, die Komplexität der Library zu maximieren und die PCR- und Amplifikations-basierenden identischen Sequenzen zu minimieren. Dazu wurden die DNA-Konzentrationen vor der Amplifikation bestimmt und die Anzahl der Amplifikationszyklen entsprechend reduziert. Insgesamt wiesen die Libraries eine sehr hohe Komplexität auf, so dass nur wenige Duplikate entfernt werden mussten.

5.1.2 Hohe Read-Qualitäten führen zu einer guten Reproduzierbarkeit der Daten

Die Reads aller Experimente wiesen eine sehr hohe Qualität, gemessen an einem *Phred score* von 30-40, auf. Um eine hohe Spezifität zu gewährleisten wurden die Reads zum Alignment strengen Qualitätskontrollen unterzogen, wie das Minimum von 90 % Read-Übereinstimmung mit dem Genom, dass nur fünf Basenfehler pro Read auftreten durften und mindestens 50 Basen eines Reads Übereinstimmung zeigen mussten. Im Durchschnitt konnte mit 70-90 % der Rohdaten eine sehr hohe Zahl der Reads aligniert werden. Nach metrischer Verrechnung und Abzug der Duplikate wurden die Reads auf 45-86 % reduziert, wobei immer noch 10-23 Mio. Reads für die Peak-Analyse zur Verfügung standen, welches einer hohen Komplexität der Libraries entspricht. Die reprimierenden Marker und die IgG-Kontrolle wurden dabei am stärksten dezimiert. Bei den reprimierenden Markern hängt dies mit der Markierung von repetitiven Sequenzen zusammen, die verstärkt im Genom auftreten und deren Reads während des Alignment-Prozesses vermehrt entfernt wurden.

Die Read-Korrelationen der Replikate wiesen sehr hohe Übereinstimmungen der aktivierenden Histonmodifikationen und leichte Abweichungen für die reprimierenden Markierungen auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Studien gezeigt, in denen die Korrelationskoeffizienten von Replikaten der reprimierenden Marker durch die geringen Anreicherungen schlechter ausfielen als bei den aktivierenden Histonmodifikationen (Herlofsen et al., 2013). Diese Abweichungen können durch die großen Fragmente des Heterochromatins entstehen. Bei der Sequenzierung werden nur die Fragment-Enden sequenziert, somit entstehen aufgrund der langen Fragmente

größere Lokalisationsunterschiede der Reads (Herlofsen et al., 2013; Teytelman et al., 2009). Da in dieser Arbeit die Analyse der Genregulation und nicht die der Heterochromatin-Formation im Vordergrund steht, sind diese Abweichungen vernachlässigbar.

Insgesamt konnten, durch die Etablierung eines neuen ChIP-seq-Protokolls für nur $3,5 \times 10^5$ Zellen, genauso viele spezifische Reads, wie in publizierten ChIP-seq Studien für 1×10^8 Zellen sequenziert werden (Ohba et al., 2015). Diese zeigten trotz der niedrigen Ausgangs-Zellzahl eine sehr große Spezifität und eine sehr hohe Komplexität.

5.1.3 Auswahl der spezifischen Algorithmen zur Peak-Detektion

Für die Peak-Analyse muss zwischen schmalen Transkriptionsfaktor-Peaks und breiten Histonmodifikations-Peaks unterschieden werden. Während die schmalen Transkriptionsfaktor-Peaks hauptsächlich mit MACS (*Model-based analysis for ChIP-Seq*) analysiert werden, ist der bekannteste Algorithmus zur Analyse der Histonmodifikationen der SICER (*Spatial clustering for identification of ChIP-enriched regions*)-Algorithmus (Xu et al., 2014; Zhang et al., 2008). Neuste Ergebnisse zeigen jedoch, dass diese Einteilung nicht mehr ausreicht, um die verschiedenen Anreicherungsformen der Histonmodifikationen umfassend zu analysieren (Gupta, 2015). Die aktivierenden Histonmodifikations-Marker bilden hohe, breite Peaks, während die reprimierenden und die H3K36me3-Modifikationen flache, breite Peaks ausbilden (Abb. 5). Deshalb wurden in dieser Arbeit zur präzisen Peak-Detektion der StrandNGS-ERD (*enriched region detection*)-Algorithmus dem SICER-Algorithmus und den verschiedenen Histonmodifikationen angepasst. Dabei wurden die Detektionsbreite und die Anzahl der vorhandenen Reads in einem Peak der Breite der Histonmodifikation-Peaks angepasst (Gupta, 2015, Xu et al., 2014).

Die in dieser Arbeit gefundene Anzahl an Peaks und annotierten Genen pro Antikörperpräzipitation waren vergleichbar mit den Werten bekannter Publikationen (Adam et al., 2015; Liu und Lefebvre, 2015; Ohba et al., 2015; Whyte et al., 2013). Dies bestätigt zum einen, dass die ChIP-Sequenzierung mit einer geringeren Zellzahl zu vergleichbaren Ergebnissen wie publizierte Daten mit höherer Zellzahlen führt und somit eine hohe Qualität der Daten vorliegt, und zum anderen, dass die Peak-Algorithmen das Auftreten der Read-Anreicherungen präzise erfassen.

5.2 ES-Zell ChIP Daten ergänzen publizierte ES-Zell Daten

Um Änderungen in den Histonmodifikationen von differenzierten Chondrozyten besser erkennen zu können, sollten sie mit den Histonmodifikationen von undifferenzierten embryonalen Stammzellen verglichen werden. Um zu überprüfen, ob mittels etablierten ChIP-seq-Protokoll für geringe Zellzahlen ähnliche Ergebnisse erzielt werden können, wurde ein ES-ChIP unter den gleichen Bedingungen, wie der der Chondrozyten hergestellt und mit dem publizierten ES-ChIP Datensatz von Mikkelsen (M-ChIP) verglichen. Mikkelsen et al. publizierte das erste Histonmodifikations-Profil von ES-Zellen, welches als Vergleich in vielen weiteren Publikationen dient (Aloia et al., 2013; Mikkelsen et al., 2007; Pauler et al., 2009; Young et al., 2011).

Interessanterweise, konnten die in dieser Arbeit hergestellten ES-ChIP Daten nahezu alle Gene nachweisen, die auch in dem Mikkelsen-Datensatz gefunden wurden. Zudem wurde eine hohe Anzahl an zusätzlichen Genen identifiziert, obwohl nur ungefähr ein Dreißigstel der Zellzahl verwendet wurde.

Der von Mikkelsen publizierte Datensatz wurde bereits 2007 erstellt, als das NGS am Anfang seiner Entwicklung stand. Die Read-Sequenzen waren noch sehr kurz und anstelle von biologischen Replikaten wurden nur Sequenzierungs-Wiederholungen angefertigt, wodurch die Komplexität der Daten nicht gesteigert wird. Somit wurde die Anzahl der Reads nach Alignment und Verarbeitung unter den hier gewählten Bedingungen auf 13-33 % reduziert. Zur Peak-Detektion verblieben nur noch 2-5 Mio Reads, wohingegen beim neuen Datensatz 14-23 Mio Reads zur Peak-Detektion zur Verfügung standen. Somit ergibt das neue ChIP-seq Protokoll trotz weniger Zellen qualitativ hochwertige Daten und wurde zum Vergleich mit den Datensätzen der Chondrozyten herangezogen. Zusätzlich konnten die Informationen über den Histon-Code in ES-Zellen durch diese Arbeit deutlich verbessert werden.

5.3 Biologische Auswertung

5.3.1 Histonmodifikationen zur Enhancer-Analyse

Das Genom besteht aus einer großen Anzahl von nicht-kodierenden, Expressions-regulierenden Elementen, wie z. B. den Enhancern. Die globale Identifizierung von Enhancern stellt eine große Herausforderung dar, da der Abstand zum regulierenden Gen mehrere tausend Basenpaare groß sein kann (Visel et al., 2009). Aktive Enhancer werden von der Histone H3 an H3K27 acetyliert, daher wird H3K27ac zur Detektion von Enhancern verwendet.

Die Anzahl der H3K27ac Peaks in proliferierenden Chondrozyten und ES-Zellen waren vergleichbar mit bekannten Publikationen von proliferierenden Chondrozyten und mesenchymalen Zellen (Cotney et al., 2012; Liu und Lefebvre, 2015). Vergleiche zu hypertrophen Chondrozyten waren nicht möglich, da in dieser Arbeit die erste ChIP-seq Analyse von reinen hypertrophen Chondrozyten erstellt wurde.

5.3.1.1 Enhancer-Detektion

In hypertrophen Chondrozyten wurden mit 14.227 Enhancer-Peaks dreimal so viele Enhancer gefunden wie in proliferierenden Chondrozyten (4.727) und eineinhalb Mal so viel wie in ES-Zellen (10.150). Die Anzahl der Enhancer fällt je nach verwendeter Methode unterschiedlich hoch aus und reicht in anderen Publikationen von wenigen 1.000 bis zu mehreren 10.000 (Adam et al., 2015; Cotney et al., 2012; Wamstad et al., 2012). In dieser Arbeit liegen somit die Enhancer-Zahlen für proliferierende Chondrozyten eher an der unteren Grenze, während sich die Zahlen für hypertrophe Chondrozyten und ES-Zellen im Mittel bewegen.

Die unterschiedliche Anzahl der publizierten Enhancer resultiert aus unterschiedlichen Nachweismethoden. Dabei werden z. B. nur H3K27ac Peaks ohne jeglichen Abzug verwendet (Cotney et al., 2012) oder es werden nur die H3K27ac Reads außerhalb der TSS verwendet. Die Wahl der Distanz um die TSS ist jedoch je nach Publikation unterschiedlich (Adam et al., 2015; Wamstad et al., 2012).

Die Verrechnungsmethode die in dieser Arbeit gewählt wurde, ist eine Anreicherung von H3K27ac über H3K9ac, um nur H3K27ac Peaks außerhalb der TSS zu detektieren (Whyte et al., 2013). Dabei werden zwar sehr viele H3K27ac Reads verworfen, aber unter diese

stringenten Bedingungen werden nur wenige Peaks als falsch positive Enhancer nachgewiesen.

5.3.1.2 Die Distanz von Enhancern zum Gen nimmt im Verlauf der Differenzierung ab

Um Enhancer lokalisieren zu können, werden sie dem nächstliegenden Gen innerhalb von 10 kb Entfernung zugeordnet, weiter entfernte werden als nicht annotierbar deklariert da ihre Zuordnung nicht eindeutig ist. Während in ES-Zellen fast die Hälfte der Enhancer nicht annotierbar waren, d. h. weiter als 10 kb vom nächsten Gen entfernt lagen, konnten in proliferierenden Chondrozyten 30 % und in hypertrophen Chondrozyten 5 % der Enhancer keinem Gen zugeordnet werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Distanz zwischen Enhancer und Gen im Verlauf der Differenzierung abnimmt. Eine ähnliche Verschiebung von distalen zu proximalen Enhancern ist beim Vergleich von ES-Zellen mit Neuronalen Progenitorzellen (NPC) zu erkennen (Creyghton et al., 2010). Die NPCs können in einem Schritt aus ES-Zellen differenziert werden und sind somit direkte Nachfolger der ES-Zellen. Bei der Enhancer-Analyse wurden in ES-Zellen 10 % mehr distale Enhancer gefunden als in den NPCs, während in NPCs die Anzahl der Enhancer in der Nähe der TSS um 20 % höher war als in ES-Zellen (Creyghton et al., 2010). In ausdifferenzierten Zellen von Herz, Leber und Gehirn scheint die Enhancer-Lokalisation konstant zu sein (Nord et al., 2013).

Die Nutzung Promotor-naher Enhancer scheint somit mit der Differenzierung gekoppelt zu sein.

5.3.1.3 Unterschiedliche Enhancerregionen regulieren die Expression der gleichen Genen in beiden Chondrozyten-Populationen

Um auf die Aktivität der Enhancer zurückzuschließen, wird als Standardmethode die Anreicherung von H3K9ac oder H3K4me3 an der TSS des korrespondierenden Gens überprüft (Adam et al., 2015; Cotney et al., 2012; Infante et al., 2015; Whyte et al., 2013). In dieser Arbeit wurden 899 identische Gene identifiziert, die sowohl in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten potentiell-aktiv sind. Der Vergleich der Enhancersequenzen wies jedoch nur 202 gemeinsame Enhancerregionen auf, d. h., dass die meisten Gene während der Differenzierung durch unterschiedliche Enhancer reguliert werden. Kürzlich publizierte Studien zur Aktivität und Funktion von

Superenhancern zeigten ebenfalls eine Änderung der Enhancer-Lokalisationen während der Differenzierung (Adam et al., 2015). Dies bedeutet, dass ein Gen über verschiedene Zelltyp-spezifische Enhancer während der Differenzierung reguliert wird.

Neben unterschiedlichen Enhancerregionen wurden auch unterschiedlich viele Enhancer in den einzelnen Zellpopulationen gefunden. In ES-Zellen gab es 10.150 Enhancer und 10.802 aktive Gene, womit jedes Gen durch einen Enhancer reguliert werden könnte. In proliferierenden Chondrozyten wurden nur 4.727 Enhancer ermittelt, aber 7.924 aktive Gene gefunden. Damit könnten entweder einige Gene keinen Enhancer oder einen zu weit entfernten Enhancer benötigen oder mehrere Gene über einen Enhancer reguliert werden. Ein bekannter Enhancer der mehrere Gene reguliert, ist der *LCR (Locus control region)*-Enhancer in Erythrozyten, der die Expression von Hämoglobin alpha bis epsilon reguliert (Holwerda und de Laat, 2013; Li et al., 2002).

In hypertrophen Chondrozyten hingegen wurden fast doppelt so viele Enhancer (14.227) wie aktive Gene (8.261) gefunden. Dies bedeutet, dass in hypertrophen Chondrozyten mehrere Enhancer benötigt werden, um ein Gen zu regulieren, wie es z. B. beim *HoxD*-Gen während der Autopod-Entwicklung vorkommt (Montavon et al., 2011). Da die Entfernung zwischen Enhancer und Gen im Verlauf der Differenzierung abnahm, ist es möglich, dass die proximalen Enhancer eine geringere Aktivität aufweisen und daher mehrere Regionen zur Aktivierung eines Gens notwendig sind.

5.3.1.4 H3K27ac markiert Enhancer schon vor- und noch nach transkriptioneller Aktivität der Gene

Interessanterweise wurden während der Überprüfung der potentiell-aktiven Gene Enhancer gefunden, deren korrespondierende Gene aufgrund der H3K27me3 Markierung als inaktiv klassifiziert wurden. In bisherige Studien wurde angenommen, dass H3K27ac das einzige Unterscheidungsmerkmal zwischen aktiven und *poised* Enhancern ist. Während H3K4me1 und p300 sowohl an aktiven als auch an *poised* Enhancern zu finden sind, wird H3K27ac nur an aktiven Enhancern identifiziert (Calo und Wysocka, 2013; Creighton et al., 2010).

Als gemeinsam reguliertes Gen von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten wurde unter anderem das *Mef2c*-Gen identifiziert. *Mef2c* wird in proliferierenden Chondrozyten exprimiert, wo, übereinstimmend mit den Expressionsdaten, alle aktivierenden Histonmodifikationen vorlagen. In hypertrophen Chondrozyten wurde

Mef2c durch H3K27me3 reprimiert, zusätzlich fehlte der Elongationsmarker H3K36me3, aber H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac Anreicherungen waren noch vorhanden. Die Vermutung liegt nahe, dass die Anreicherung von H3K27ac am Enhancer, ebenso wie an der TSS, noch nicht reduziert wurde obwohl das Gen schon inaktiv ist.

Diese Hypothese wird durch publizierte Enhancer Aktivitätsexperimente unterstützt. In dieser Studie zeigten nur 20 von 30 durch H3K27ac und H3K4me1 markierte Enhancern eine Aktivität *in vitro* (Zentner et al., 2011). Demzufolge könnten die H3K27ac Markierungen auch an Enhancern von nicht mehr aktiven Genen vorhanden sein, in denen möglicherweise die Verbindung zwischen Enhancer und Gen noch nicht getrennt wurde. Zudem könnte die Aktivität der Enhancer von spezifischen Regulatoren wie Sox9 oder Runx2 abhängig sein, sodass die Enhancer zwar durch H3K27ac markiert sind, aber das Fehlen der Transkriptionsfaktoren die Aktivierung verhindert oder reprimierende Faktoren an dem Enhancer gebunden sind.

Diese Daten zeigen, das H3K27ac nicht nur an aktiven Genen vorliegt, sondern auch an Enhancern, deren korrespondierende Gene nicht transkriptionell-aktiv sind und somit während der Differenzierung abgeschaltet wurden.

Um herauszufinden, welche Enhancer aktiv Gene induzieren und welche ihre Aktivität verloren haben, wurden alle Gene, denen Enhancer zugeordnet werden konnten, mit den aktiven Genen, gemessen am Auftreten aller vier aktivierenden Histonmodifikationen verglichen. Dabei wurden Enhancer in proliferierenden Chondrozyten gefunden, deren korrespondierendes Gen nur in hypertrophen Chondrozyten angeschaltet war. Ebenso wurden Enhancer in hypertrophen Chondrozyten identifiziert, deren korrespondierende Gene nur in proliferierenden Chondrozyten aktiv waren.

Die Zuordnung der Enhancer zu aktiven Genen zeigte einen signifikanten Anstieg Chondrozyten-spezifischer GO-Terms in proliferierenden Chondrozyten und Histon-modifizierender GO-Terms in hypertrophen Chondrozyten. Zum einen wird dadurch bestätigt, dass Enhancer Zelltyp-spezifisch agieren (Ohba et al., 2015) und zum anderen, dass eine signifikant erhöhte Aktivität an Genen in hypertrophen Chondrozyten vorliegt, die für Histon-modifizierende Enzyme kodieren. Dies ist von großer Bedeutung, da die Anzahl der Histonacetylierungs- und Trimethylierungs-Peaks im Verlauf der Differenzierung zunahm und dadurch die globale Änderung der Chromatinstruktur bestätigt wird. Dies korreliert mit einer bereits beobachteten globalen Zunahme der

Histonacetylierung während der Chondrozytendifferenzierung *in vitro* (Masterarbeit Thiesen A.M., 2012).

5.3.1.5 Enhancer aktiver Gene besitzen Sox9 Bindungsstellen in proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten

Zur Bestätigung Chondrozyten-spezifischer Enhancer wurden publizierte Sox9 ChIP-seq-Daten (Ohba et al., 2015) mit den gewonnenen ChIP-seq-Daten verglichen.

Grundsätzlich muss bei der Interpretation der Daten beachtet werden, dass zur Generierung der Sox9-Daten keine reinen Chondrozyten-Populationen, sondern eine Mischkultur aus proliferierenden und prähypertrophen Rippen Chondrozyten, inklusive des angrenzenden Gewebes, verwendet wurden. Zudem gab es Unterschiede in den verwendeten Entwicklungsstadien der Chondrozyten.

Interessanterweise stimmten die Enhancer der proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten mit Sox9-Bindestellen überein. Dabei wurden überraschenderweise mehr Sox9-bindende Enhancer in hypertrophen als in proliferierenden Chondrozyten identifiziert. Dies kann durch die hohe Anzahl von 14.227 Enhancern in hypertrophen Chondrozyten im Gegensatz zu nur 4.727 Enhancern in proliferierenden Chondrozyten begründet sein. Außerdem zeigen publizierte Daten, dass das Sox9-Protein über die mRNA-Expression hinaus auch in hypertrophen Chondrozyten zu finden ist und dort gemeinsam mit Mef2c die *Col10a1*-Expression steigert (Dy et al., 2012). Um die Relevanz von Sox9 in hypertrophen Chondrozyten genauer zu untersuchen, müsste jedoch eine Sox9 ChIP-Sequenzierung in hypertrophen Chondrozyten durchgeführt werden.

Obwohl Sox9 essentiell für die Chondrozytendifferenzierung ist, zeigt es auch regulierende Funktionen in anderen Zelltypen und kann somit auch Gene markieren, welche nicht Chondrozyten-spezifisch sind. Unter anderem wurden Sox9-Bindestellen auch zur Detektion von Superenhancern in der Haarfollikelentwicklung verwendet (Adam et al., 2015). Die Beteiligung von Sox9 an einer Vielzahl anderer Prozesse würde die hohe Anzahl von 16.019 Sox9-regulierten Genen erklären. Gemessen an der RNA-Pol II Detektion wurden mehr durch Sox9 regulierte Gene als aktive Gene (13.933) gefunden. Hierbei handelt es sich möglicherweise vereinzelt auch um ektopische Bindungen, die nicht regulierend sind.

5.3.2 Detektion aktivierenden Histonmodifikationen an Zelltyp-spezifischen Genen

In proliferierenden Chondrozyten lagen an Zelltyp-spezifischen Genen, wie *Sox9*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox5*, *Sox6*, *Runx2*, *Ihh* und *Gli3* alle vier aktivierenden Histonmodifikationen (H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3) vor, die eine Transkription des jeweiligen Gens anzeigen (Chen et al., 2011; Wang et al., 2008). In hypertrophen Chondrozyten wurde das *Col10a1*-Gen als transkriptionell-aktiv markiert. Die ES-Zellen wiesen ebenfalls nur an den ES-spezifischen Genen *Oct4* und *Sox2* alle vier Markierungen auf. Zudem konnte am *Neurod1*-Gen, welches nur in neuronalen Zellen aktiv ist, in keinen der Zellpopulationen eine transkriptionelle Aktivität verzeichnet werden. Dies untermauert die Zuverlässigkeit der generierten Daten und der ChIP-seq Methode.

Sox9 ist der Masterregulator der Chondrozytendifferenzierung. Die Expressionsdaten von *Sox9* spiegeln sich deutlich in den Histonmodifikations-Mustern am *Sox9*-Gen wieder (Wright et al., 1995; Zhao et al., 1997). Übereinstimmend mit den Expressionsdaten wiesen die Kooperationspartner von *Sox9*, *Sox5* und *Sox6*, ebenso wie die Zielgene *Col2a1* und *Acan* alle vergleichbare aktivierendende Histonmodifikations-Muster in proliferierenden Chondrozyten auf.

Interessanterweise zeigte sich, dass sich an vielen aktiven Genen der proliferierenden Chondrozyten eine Repression durch H3K27me3 in hypertrophen Chondrozyten zeigte und damit das typische Charakteristikum von bivalenten Genen aufwiesen (Alder et al., 2010; Bernstein et al., 2006). Zusätzlich zu der Repression in hypertrophen Chondrozyten waren die Anreicherungen der aktivierenden Histonmodifikationen stark dezimiert.

Unerwartet war das reprimierende Histonmodifikations-Muster des *Runx2*-Gens in hypertrophen Chondrozyten, da *Runx2* essentiell für die hypertrophen Differenzierung der Chondrozyten und für die Ossifikation ist (Yoshida et al., 2004). Die mRNA-Expression von *Runx2* beginnt bereits in den mesenchymalen Kondensationen des E11.5 Embryos und wird während der Differenzierung in proliferierende Chondrozyten des E13.5 Embryos aufrechterhalten. Dieses Expressionsmuster stimmt mit den Histonmodifikations-Daten in proliferierenden Chondrozyten überein. Obwohl im E14.5 und E15.5 Embryo die mRNA von *Runx2* hauptsächlich in prähypertrophen- und schwach in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen werden kann, zeigten die

Histonmodifikationen in hypertrophen Chondrozyten keine transkriptionelle Aktivität des *Runx2*-Gens (Gross et al., 2012; Stricker et al., 2002). Die mRNA scheint daher während der Differenzierung stabilisiert zu werden. Dies wird durch die Publikation von Smith et al. unterstützt, da die *Runx2*-mRNA bereits im E11.5 Embryo exprimiert wird, das Runx2-Protein hingegen erst im E13.5 Embryo nachgewiesen werden konnte (Smith et al., 2005). Somit steht das reprimierende Histonmodifikations-Muster des *Runx2*-Gens nicht im Widerspruch mit dem Auftreten des Runx2-Proteins.

5.3.2.1 Unspezifische Readblöcke scheinen auf eine veränderte Chromatin-Struktur zu beruhen

Neben den typischen Histonmodifikations-Mustern, die auf transkriptionell-aktive- oder reprimierte Gene hinwiesen, sind an den Genen von *Col2a1*, *Col10a1* und *Ihh* unspezifische Bindungen aufgetreten. Diese konnten in anderen Genen nicht nachgewiesen werden. Der genaue Grund für die unspezifischen Bindungen konnte nicht eindeutig geklärt werden. Eine Möglichkeit, die das Auftreten erklären könnte, ist eine Transkriptions-abhängige Veränderung der Chromatin-Struktur. Durch die starke Dekondensation des Chromatins zur Transkription, die Entfernung der Nukleosomen um die TSS und die Öffnung der DNA-Struktur zur Bindung von Transkriptions-Aktivatoren und Proteine der RNA-Polymerase-Maschinerie, entsteht eine Sollbruchstelle, die während der Fragmentierung als erstes bricht. Diese Scherungs-sensiblen Sequenzen konnten bereits mit Transkriptionsfaktorbindungsstellen und mit den DNaseI-Schnittstellen in Verbindung gebracht werden, welche im Input zu überrepräsentativen Anreicherungen führten und mit der Transkription korrelierten (Teytelman et al., 2009). Übereinstimmend damit wies *Col2a1* in proliferierenden-, *Col10a1* in hypertrophen- und *Ihh* als Marker der prähypertrophen Chondrozyten unspezifische Bindungen, auch in der Negativkontrolle IgG auf.

In bisherige Analysen der Histonmodifikations-Verteilung am *Col2a1*-Gen, einer Mischkultur aus Rippen-Chondrozyten und des angrenzenden Gewebes, wurden keine Readblöcke beschrieben, wobei zusätzlich in Altersunterschied zwischen den hier untersuchten E13.5 Zellen zu P1-Chondrozyten besteht (Ohba et al., 2015). Nach einer *in vitro* Differenzierung von humanen mesenchymalen Zellen in Chondrozyten, wies die Histonmodifikations-Verteilung der *Col2a1*-Gensequenz ebenfalls keine vergleichbaren Readblöcke auf (Herlofsen et al., 2013). Dabei handelte es sich aber ebenfalls um eine

Mischpopulation aus mesenchymalen Zellen und Chondrozyten verschiedener Differenzierungsstadien. Beide Zelltypen sind keine reinen Chondrozyten-Populationen, sodass das Chromatin von Collagen 2-exprimierenden mit Collagen 2-negativen Zellen präzipitiert wurde. Dieses wiederum führt zu einer Reduktion der Reads am *Col2a1*-Gen. Insgesamt wurden diese unspezifischen Bindungen nur an diesen drei Chondrozyten-spezifischen Genen beobachtet. Die Analyse der IgG-Peaks ergab, dass insgesamt nur 400 IgG-Peaks vorlagen, die hauptsächlich außerhalb von Genen lokalisiert waren (Daten nicht gezeigt), deshalb ist davon auszugehen, dass diese unspezifischen Bindungen am *Col2a1*-, *Col10a1*- und *Ihh*-Gen auf eine veränderte Chromatinstruktur zurück zu führen sind, durch die hohe transkriptionelle Aktivität dieser Gene.

5.3.3 Transkriptionell-aktive Gene zeigen eine signifikante Anreicherung in Chondrozyten-spezifischen Signalwegen

Obwohl ein Großteil der aktiven Gene in beiden Chondrozytenpopulationen vorkam, war die Anzahl von transkriptionell-aktiven Genen in hypertrophen Chondrozyten vergleichsweise höher. Mittels GO- und Signalweg Analysen wurden nur in proliferierenden Chondrozyten signifikante Anreicherungen Chondrozyten-spezifischer Gene identifiziert. In hypertrophen Chondrozyten dagegen wurden stattdessen erhöhte Anreicherungen in Apoptose- und Zellzyklusgruppen gefunden. In den Zellzyklusgruppen konnten die bekannten Cdk-Inhibitoren p21 und p27 nachgewiesen werden. Zellzyklus-abhängige Kinasen (Cdk) werden von Cdk-Inhibitoren reguliert (Nakayama und Nakayama, 1998; Sherr und Roberts, 1999). Die Cip/Kip Mitglieder p21 und p27 reprimieren Cdk2, 3, 4 und Cdk6 und führen so zum Zellzyklusarrest (LaBaer et al., 1997; Sherr und Roberts, 1999). In Chondrozyten wird p21 hauptsächlich in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert (Parker et al., 1995). Ebenso kommt es zu einer stetigen Expressionszunahme von p21 und p27 während der hypertrophen Chondrozytendifferenzierung *in vitro*, welches mit der Proliferationsabnahme korrelierte (Negishi et al., 2001). Bei der signifikanten Anreicherung von Apoptose-spezifischen Genen handelte es sich überwiegend um pro-apoptotische Gene, deren gemeinsames Auftreten apoptotische Prozesse einleiten. Somit werden diese Zellzyklus-Inhibitoren für den Austritt aus dem Zellzyklus benötigt und sind, wie die pro-apoptotischen Proteine, ein Charakteristikum der hypertrophen Chondrozyten (Hatori et al., 1995). Insgesamt weisen diese GO-Terms auf das Austreten aus dem Zellzyklus hin.

Ebenfalls interessant ist der gefundene Anteil an anti-apoptotischen Genen, die einen Hinweis auf die Transdifferenzierung der hypertrophen Chondrozyten sein könnte. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht alle hypertrophen Chondrozyten in Apoptose gehen, sondern ein Teil in mesenchymale Vorläuferzellen dedifferenziert und so am Aufbau des Knochens beteiligt sind (Tsang et al., 2015; Yang et al., 2014; Zhou et al., 2014). Diese Transdifferenzierung wurde auch in dieser Arbeit bei der Expressionsanalyse von YFP in den transgenen Mäusen bestätigt. Die YFP-positiven Zellen der Chondrozyten-Linie wurden eindeutig in der mineralisierten Zone nachgewiesen. Das gleichzeitige Auftreten von anti- und pro-apoptotischen Genen könnte deshalb auf zwei unterschiedliche Zellpopulationen mit unterschiedlichen Zellschicksalen in den hypertrophen Chondrozyten hindeuten.

5.3.4 Die Anzahl reprimierender Markierungen steigt während der hypertrophen Differenzierung an

Die Peak-Analyse zeigte eine globale Zunahme der reprimierenden Histontrimethylierungen, welche mit dem beschriebenen Anstieg der Expression von H3K9-abhängigen Hmts in prähypertrophen Chondrozyten übereinstimmt (Ideno et al., 2013). Während H3K9 von verschiedenen Hmts methyliert werden kann, katalysiert nur eine Hmt, die Ezh2 des Polycomb-Repressiv-Komplexes (PRC), die H3K27 Trimethylierung. PRC wurden außer in pluripotenten Zellen und auch in verschiedenen, differenzierten Zelltypen gefunden (Bracken et al., 2006). In Chondrozyten resultierte ein Verlust der Methyltransferase Ezh2 in einer verminderten Chondrozytendifferenzierung, welches H3K27me3 als wichtigen, regulativen Faktor der Chondrozytendifferenzierung bestätigt (Schwarz et al., 2014). Als Gegenspieler des PRC in Chondrozyten wurde die Hdm JMJD3 identifiziert. JMJD3 reguliert Chondrozyten-spezifische Gene, wie *Ihh* und *Runx2*, über die reprimierende H3K27me3 Markierung (Zhang et al., 2015). Der PRC und der Trithorax-Komplex, welcher H3K4me3 methyliert, regulieren gemeinsam bivalente Gene in ES-Zellen (Aloia et al., 2013; Schuettengruber et al., 2011). Zusätzlich zur Zunahme von bivalent-regulierten Genen wurde die Anzahl der alleinig durch H3K27me3 markierten Gene im Verlauf der Differenzierung gesteigert. Diese H3K27me3-Markierungen könnten möglicherweise neuen, noch unbekannten, differenzierungsspezifischen Funktionen dienen. Es ist noch nicht bekannt, wie eine globale Zunahme der H3K27me3 erreicht werden kann. Entweder wird PRC während der

Chondrozytendifferenzierung vermehrt exprimiert oder seine Antagonisten dezimiert. Dies müsste in weiteren Versuchen, z. B. durch einen immunhistologischen Nachweis oder mittels *in situ* Hybridisierung, geklärt werden.

5.3.5 Genregulation durch bivalente Markierung

5.3.5.1 Zunahme an bivalent-markierten Genen während der Chondrozytendifferenzierung

Die bivalente Markierung von Genen wurde mehrfach bei der Analyse von Zelltyp-spezifischen Genen in ES-Zellen und Chondrozyten beobachtet. Während in proliferierenden Chondrozyten nur 4.161 Gene gleichzeitig durch H3K4me3 und H3K27me3 markiert waren, wurden in hypertrophen Chondrozyten 7.173 Gene bivalent markiert. Obwohl solche bivalenten Gene bisher hauptsächlich in ES-Zellen beschrieben wurde, konnte dieser Regulationsmechanismus hier als grundlegender Bestandteil der Chondrozytendifferenzierung identifiziert werden. Dabei blieb die Anzahl an H3K4me3 markierten Genen konstant, während die Anzahl an H3K27me3 markierten Genen im Verlauf der hypertrophen Differenzierung stark anstieg.

Während der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen in Erythrozyten Vorläuferzellen wurde ein entgegengesetzter Verlauf der Regulation beobachtet. Die globale Markierung durch H3K27me3 blieb konstant während die Anzahl an H3K4me3 markierten Genen abnahm (Cui et al., 2009). Dies entspricht im Verhältnis zu den aktiven Genen ebenfalls einer Zunahme an reprimierten Genen, wie es auch in der Chondrozytendifferenzierung beobachtet wurde.

5.3.5.2 Bivalente Markierungen dienen als Langzeit-Mechanismus der Repression von Entwicklung-spezifischen Genen

Das Auftreten von der bivalenten Markierung mit H3K4me3 und H3K27me3 wurde bisher als Mechanismus zur Feinregulation der Transkription angenommen (Voigt et al., 2013). Damit wird ein schnelles An- und Abschalten der Gene ermöglicht, um flexibel auf die schnellen Veränderungen während der embryonalen Entwicklung reagieren zu können. Durch den Vergleich der bivalenten Gene aller Zelltypen wurden jedoch 3.185 Gene identifiziert, die im Verlauf der Differenzierung durchgängig diese Markierung

behielten. Dies entspricht 34 % aller bivalent-markierten Gene. Bei diesen Genen handelte es sich überwiegend um Entwicklungs- und Differenzierungs-spezifische Gene, wie z. B. die der neuronalen Entwicklung. Ebenfalls wurde beim Vergleich von zwei Differenzierungsstadien der hämatopoetischen Stammzelllinie 27 % identische Gene mit bivalenten Markierung nachgewiesen (Cui et al., 2009). Diese Daten zeigen, dass bivalente Markierungen nicht nur als Feinregulation sondern auch als Langzeit-Mechanismus zum Abschalten von Genen verwendet werden. Dies ist ein neuer, noch nicht beschriebener Regulationsmechanismus der Zelldifferenzierung, der die Repression Entwicklungsspezifischer Gene über die Zellteilung und Differenzierung aufrechterhält.

5.3.6 Einige Gene zeigen unterschiedliche Histonmodifikations-Profile während der Differenzierung trotz ähnlicher Expression

Durch die Vergleiche der Histonmodifikationen an einer Vielzahl von Genen, konnten grundlegende Mechanismen der Transkription entdeckt werden. Die Histonmodifikations-Muster von *Sox5* und *Sox6* geben z. B. Aufschlüsse über die Regulation der Histonmodifikationen vor dem Beginn bzw. nach dem Ende der Transkription. *Sox5* und *Sox6* werden von *Sox9* aktiviert und beginnen ihre Expression bereits vor der Differenzierung in proliferierende Chondrozyten, werden aber, wie *Sox9*, nicht mehr in hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Die mRNA-Expressionsdaten von *Sox5* und *Sox6* weisen auf eine gleichmäßige Expression in proliferierenden- und prähypertrophen Chondrozyten hin (Lefebvre et al., 1998). Die Histonmodifikations-Daten lassen darauf schließen, dass die *Sox5* Transkription erst in den proliferierenden Chondrozyten initiiert und ebenfalls dort beendet wird, da weder in ES-Zellen noch in hypertrophen Chondrozyten Anreicherungen am *Sox5*-Gen erkennbar waren. Im Gegensatz dazu wies das *Sox6* Gen bereits in ES-Zellen Anreicherungen auf, die auf eine Vorbereitung der Transkription hindeuten, während in hypertrophen Chondrozyten neben der Repression von H3K27me3 nicht immer alle aktivierenden Anreicherungen reduziert waren. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass *Sox6* in ES-Zellen als *geprimtes* Gen vorliegt, um während der Differenzierung in andere Zelltypen angeschaltet zu werden. Um die Regulation genauer bestimmen zu können müssten zum Vergleich anstelle von ES-Zellen mesenchymale Stammzellen verwendet werden, die in einem Schritt in Chondrozyten differenziert werden können. Insgesamt

traten bei einigen Genen trotz gleicher Expressionsdaten unterschiedliche Histonmodifikations-Profile während der Chondrozytendifferenzierung auf.

Ähnliche Muster zeigten die ES-Zell-spezifischen Gene. Während *Oct4* sowohl in proliferierenden- als auch in hypertrophen Zellen keine Anreicherung von Histonmodifikationen aufwies, wies das *Sox2*-Gen in proliferierenden Chondrozyten eine Repression durch H3K27me3 und einige aktivierende Histonmodifikationen auf. Im Verlauf der Differenzierung wurden diese weiter reduziert, waren aber in hypertrophen Chondrozyten immer noch vorhanden. Warum die Reduktion der Histonmodifikationen bei einem Gen länger dauern kann als bei einem anderen, könnte im Falle von *Oct4* und *Sox2* auch lokalisationsbedingt sein. Da *Sox2* weit entfernt von transkriptionell-aktiven Genen liegt, könnte die Umorganisation der Histonmodifikationen von *Sox2* nicht im Vordergrund der Chromatin-Strukturierung liegen. *Oct4* hingegen liegt in der Nähe von vielen in Chondrozyten aktiven Genen und unterliegt damit möglicherweise einem stärkeren Histonmodifikations-Umsatz.

Die Histonmodifikationen zur Regulation der Transkription weisen somit auf dynamische Änderungen hin, die schnell, wie im Falle von *Sox5* und *Oct4*, oder lange vorbereitet und langsam reprimiert werden können, wie sie bei *Sox6* und *Sox2* zu beobachten war.

Sox9 aktiviert sowohl *Sox5* als auch *Sox6*. Dabei stellt sich die Frage, ob unterschiedliche Histonmodifikationen auf unterschiedliche Mechanismen der Initiation der Transkription hinweisen. Ebenfalls könnten der schnelle Abbau oder die anhaltenden Anreicherungen nach Termination der Transkription auf unterschiedliche Mechanismen hindeuten. Diese Hypothesen müsste in detaillierten Transkriptionsanalysen bestätigt werden.

5.3.7 Histonmodifikations-Profile offenbaren Regulationsmuster zur Transkription Chondrozyten-spezifischer Gene

Während der Analyse Zelltyp-spezifischer Gene wurden Regelmäßigkeiten in den Anreicherungsprofilen entdeckt. Es ist bereits bekannt, dass H3K4me3 zur Initiation benötigt wird und dass die H3K9ac Markierung auf die H3K4me3 Markierung folgt. Eine Reihenfolge der anderer Histonmodifikationen war bisher noch unbekannt (Wang et al., 2008).

Zur Initiation der Transkription wurden zwei Muster beobachtet:

Zum einen wurden nur aktivierende Histonmodifikationen in der Reihenfolge H3K4me3, H3K9ac und H3K27ac angereichert, bis anschließend die Elongation der Transkripte durch die RNA-Polymerase und H3K36me3 erfolgte.

Zum anderen lag zuerst H3K4me3 gemeinsam mit der reprimierenden H3K27me3-Histonmodifikation als bivalente Markierung vor, woraufhin weitere aktivierende Histonmodifikationen angereichert wurden. Dabei wurde H3K36me3 immer als letztes angereichert und H3K27me3 gleichzeitig dezimiert. Ob nur die Modifikationen H3K4me3 und H3K27me3 allein die Initiation starten oder ob es eine Kombination aus H3K4me3, H3K9ac und H3K27me3 ist, konnte nicht eindeutig geklärt werden.

Bei der Termination der Transkription konnte ein einheitlicher Mechanismus entdeckt werden, bei dem immer erst eine Anreicherung von H3K27me3 um die TSS erfolgt, bevor die aktivierenden Histonmodifikationen reduziert werden. Dabei traten bei einer Vielzahl der Gene H3K4me3 und H3K27me3 oder die Kombination aus H3K4me3 und H3K9ac als letzte Anreicherungen nach Reduktion der Modifikationen auf, bis zum Schluss nur H3K4me3 übrig blieb. Somit stimmen die ersten Histonmodifikationen der Transkriptions-Initiation mit denen der Termination überein.

5.3.8 Die Höhe der Peaks könnte mit der Transkriptionsrate korrelieren

Beim Vergleich der aktiven Gene untereinander wurden Unterschiede in der Peak-Höhe gefunden, z. B. bei *Acan* und *Runx2* in proliferierenden Chondrozyten. Die Anreicherungen der Reads könnten Aufschlüsse über die Transkriptions-Aktivität geben, da z. B. *Acan* höhere und breitere Peaks als *Runx2* aufwies. Diese Read-Anreicherung würde mit publizierten Expressionsdaten übereinstimmen. Während der Transkriptionsfaktor *Runx2* nur schwach in proliferierenden Chondrozyten exprimiert wird (Takeda et al., 2001), werden große Mengen von EZM-Molekülen wie *Acan* gebildet (Han und Lefebvre, 2008). Somit könnten hohe Peaks mit einer hohen Read-Dichte auf eine hohe Transkription schließen lassen. Dies müsste mit spezifischen Algorithmen überprüft und mit Expressionsdaten verglichen werden.

Mit dieser Arbeit konnten erstmals wichtige Erkenntnisse über die Änderungen der Histonmodifikationen während der Chondrozytendifferenzierung gewonnen werden. Global wurde eine Zunahme von Histonacetylierung und -Trimethylierung während der Differenzierung entdeckt. Zudem wurden zur Regulation der gleichen Gene Zelltyp-spezifische Enhancer entdeckt.

Die bivalente Markierung von Genen konnte als essentieller Mechanismus der Chondrozytendifferenzierung identifiziert werden. Neben der Vorbereitung der Expression, die bereits in ES-Zellen beschrieben wurde, ist ein Langzeit-Mechanismus entdeckt worden, mit dem Entwicklungs-spezifische Gene dauerhaft reprimiert werden können.

Außerdem wurde ein Regulationsmechanismus der Transkription ermittelt, welcher die Reihenfolge der Anreicherungen von den Histonmodifikationen aufzeigt.

Zusammenfassend konnten, neben globalen Veränderungen der Histonmodifikationen während der Chondrozytendifferenzierung, grundlegende Histonmodifikations-Muster der transkriptionellen Regulation aufgedeckt und nachgewiesen werden.

5.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse über die epigenetische Regulation der Chondrozytendifferenzierung gewonnen werden. Dazu wurden Histonmodifikationen untersucht, die gezielt verschiedene Aspekte der Genregulation abdeckten. Zu den grundlegenden Histonmodifikationen, die hier untersucht wurden gibt es ähnliche Modifikationen, die vergleichbare Aussagen zur Genregulation zulassen würden. Um die umfassende Analyse des Histon-Codes während der Differenzierung zu erweitern, könnten zusätzliche Histonmodifikationen analysiert werden. Damit könnte zum einen eine detailliertere Aussage über die genaue Reihenfolge der Modifikationen zur Transkription festgelegt werden und zum anderen die Übereinstimmungen der Enhancer-Aktivität mit Expressionsdaten bestätigt werden. Zur Enhancer-Analyse ist es möglich, zusätzlich die H3K4me1-Modifikation zu untersuchen, da H3K4me1 nicht nur aktive sondern auch *poised* Enhancer markiert (Creyghton et al., 2010). Des Weiteren könnte die Elongation der Transkripte durch der RNA-Polymerase durch die Methylierung von H3K79 bestätigt werden, da diese Modifikation, im Gegensatz zu H3K36me3, am 5'Ende der kodierenden Sequenz angereichert wird (Bannister et al., 2005; Karlic et al., 2010). Eine Expressionsanalyse wäre nicht nur zur Bestätigung der Daten von Transkriptions-aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikationen von Nutzen, sondern auch, um die Zunahme der globalen Histontrimethylierung und -acetylierung durch eine mögliche gesteigerte Expression der dafür zuständigen Enzyme erklären zu können. Zur Erstellung eines Transkriptoms wäre eine RNA-Sequenzierung die Methode der Wahl.

Zur weiteren Enhancer-Analyse könnte das *Circularized Chromosome Conformation Capture* (4C) durchgeführt werden. Mit Hilfe des 4C können zum einen die Enhancer eindeutig ihren aktiven Genen zugeordnet werden und zum anderen können die Distanzen zwischen den Genen und den regulatorischen Sequenzen bestimmt werden. Diese Methode würde zudem bestätigen, ob mehrere und wenn ja wie viele Enhancer in den jeweiligen Zellpopulationen benötigt werden, um Gene zu aktivieren und wie sich die Zusammensetzung der regulierenden Enhancer mit zunehmender Differenzierung verändert.

Weiterhin ist es möglich, die Daten der proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten mit ausdifferenziertem Knorpel, z.B. der Gelenke, zu vergleichen. Nach der endochondralen Ossifikation verbleibt der Knorpel an den Gelenken und stellt somit

einen weiteren Differenzierungsschritt dar (Gardner und O'Rahilly, 1968). Die Chondrozyten des artikulären Knorpels machen, im Gegensatz zu der proliferierenden- und hypertrophen Zone, nur etwa 5 % der Gesamtmasse des Knorpels aus. Der Großteil des Gewebes besteht aus Wasser, Collagenen und Proteoglykanen, zur Bildung einer glatten Oberfläche, um dadurch das reibungslose Gleiten der Gelenkflächen und das Übertragen von Druck- und Scherkräfte auf den Knochen zu ermöglichen (Poole et al., 1993). Durch die systematische Untersuchung der Histonmodifikationen von differenzierten, artikulären Chondrozyten könnte ebenfalls ein Histonmodifikations-Profil erstellt werden und dieses mit denen der ES-Zellen und embryonalen Chondrozyten verglichen werden. Interessant wäre herauszufinden, ob es ebenfalls zu einer globalen Änderung der Histonmodifikationen im Vergleich zu den hier beschriebenen Profilen kommt. Zudem könnten die Analyse von bivalente Genen zeigen, ob die Entwicklungs- und Differenzierungs-spezifischen Gene, wie z. B. der neuronalen Entwicklung, weiterhin als bivalente Gene vorliegen oder ob den postnatalen, ausdifferenzierten Zellen, diese Regulation aufgehoben wird. Ein weiterer Ansatz wäre, zusätzlich zum Histonmodifikations-Profil von gesunden artikulären Chondrozyten, ein Histonmodifikations-Profil von arthrotischen Gelenken zu erstellen und mit diesen zu vergleichen. Es ist bekannt, dass Expressionsänderungen während der Entwicklung von Arthrose auftreten. Ob es aber zu globalen Veränderungen der Histonmodifikationen kommt und welche Auswirkungen diese haben könnten, ist noch nicht bekannt (Bau et al., 2002; Roach et al., 2007; Troeberg und Nagase, 2012). Es gibt einige Hinweise, dass Hdacs in Arthrose-Patienten vermehrt exprimiert werden und Hdac-Inhibitoren den Knorpelabbau reduzieren, womit eine gute Grundlage zur Analyse gegeben ist (Chen et al., 2011; Higashiyama et al., 2010; Hong et al., 2009).

Zur Erweiterung der vorhandenen Datensätze sollte ein Transkriptionsfaktor-ChIP-seq von z. B. Runx2 und Sox9 in hypertrophen Chondrozyten durchgeführt werden, um die Spezifität der Enhancer und die Interaktion der Transkriptions-Maschinerie mit den epigenetischen Markierungen zu untersuchen.

Parallel dazu wäre es zielführend, die Verrechnungsmethoden der ChIP-seq-Daten zu erweitern. Während der Analyse Zelltyp-spezifischer Gene konnten unterschiedliche Peak-Höhen und Peak-Breiten festgestellt werden. Manche Peaks einer Histonmodifikation zentrierten sich nur um die TSS, während andere Peaks über die TSS und die kodierende Sequenz verteilt waren und dann abflachten. Dies wurde innerhalb

eines Zelltyps an verschiedenen Genen und auch zwischen verschiedenen Differenzierungsstadien der gleichen Gene beobachtet. Gene, welche in allen Zelltypen exprimiert wurden, wie z. B. das *Abca1*-Gen (*ATP-binding cassette transporter A1*) ein ABC-Transporter von Cholesterin und Phospholipiden in der Zellmembran (Denis et al., 2003), wiesen dabei nicht zwangsläufig gleiche Peak-Höhen und Peak-Dichten auf. Diese differentiellen Verteilungen könnten Aufschlüsse über die Transkriptionsrate der Gene geben. Für diese Analysen müsste ein Algorithmus generiert werden, der die Unterschiede in den Read-Anreicherungen innerhalb eines Zelltyps und zwischen verschiedenen Zelltypen errechnen kann. Dies sollte mit einer Expressionsanalyse gekoppelt werden, um die Expression mit der Peak-Höhe bzw. der Anreicherung korrelieren zu können.

Insgesamt konnten mit dieser Arbeit fundamentale Grundlagen der transkriptionellen Regulation durch Histonmodifikationen offengelegt und eine globale Histonmodifikations-Änderung während der Differenzierung aufzeigt werden. Diese bilden eine hervorragende Basis, um weitergehenden Untersuchungen, wie der differentiellen Peak-Analyse und der Zuordnung von Enhancern zu ihren korrespondierenden Genen durch 4C, durchzuführen. Zudem können die Daten über die Veränderung der Histonmodifikationen während der enchondralen Ossifikation zu einem Vergleich mit weiteren Zelltypen, wie z.B. gesundem und arthrotischem artikularem Knorpel oder aber auch mit Mesenchym- und Knochenzellen, herangezogen werden.

6 Zusammenfassung

Während der enchondralen Ossifikation ist die geordnete Differenzierung von proliferierenden- zu hypertrophen Chondrozyten der entscheidende Schritt, der für das Auswachsen und die Länge des späteren Knochens verantwortlich ist. Zuerst bilden die Chondrozyten eine Knorpelzwischenstufe, die daraufhin durch Knochen ersetzt wird. Die Chondrozytendifferenzierung wird über ein komplexes Netzwerk von regulatorischen Molekülen, wie Transkriptionsfaktoren und Morphogenen, reguliert (Wuelling et al., 2013; Wuelling und Vortkamp, 2010). Bisherige Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass essentielle Transkriptionsfaktoren der Chondrozytendifferenzierung mit Histonmodifizierenden Enzymen interagieren und deren Aktivität regulieren (Wuelling et al., 2013). Weiterhin tritt im Verlauf der Chondrozytendifferenzierung ein globaler Anstieg der Histonacetylierung *in vitro* auf (Masterarbeit Thiesen A.M., 2012), doch die zugrundeliegenden epigenetischen Mechanismen sind bisher weitgehend unbekannt.

Um die epigenetischen Veränderungen während der Chondrozytendifferenzierung zu untersuchen wurden proliferierende- und hypertrophe Chondrozyten mittels FACS (*fluorescent activated cell sorting*) aus den Skelettanlagen transgener Mäuse isoliert. Dazu wurden transgene Mäuse verwendet, die *Yellow fluorescent protein* unter Zelltypspezifischen Promotoren exprimierten. Ein ChIP-seq (Chromatin Immunopräzipitation mit anschließender Sequenzierung) Protokoll für geringe Zellzahlen wurde etabliert und das Chromatin sequenziert.

Zur systematischen Analyse der Histonmodifikationen wurden sowohl aktivierende- als auch reprimierende Histonmodifikationen untersucht. Als Marker für transkriptionell-aktive Gene wurde die Kombination aus den vier aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac und H3K36me3 verwendet, für bivalente Gene H3K4me3 und H3K27me3, für reprimierte Gene H3K9me3 und H3K27me3 und zur Enhancer Detektion H3K9ac und H3K27ac (Wang et al., 2008).

Die biologischen Replikate von proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten wiesen eine hohe Korrelation sowohl auf Read- als auch auf Gen-Ebene auf. Die Anzahl der Peaks und der damit detektierten Gene war für die aktivierenden Histonmodifikationen H3K4me3, H3K9ac und H3K36me3 in beiden Zelltypen nahezu identisch. In hypertrophen Chondrozyten war die Anzahl für die reprimierenden Histonmodifikationen stark und für H3K27ac leicht erhöht, was auf eine globale Zunahme der Histonacetylierung und –Trimethylierung während der Differenzierung hindeutet.

Um epigenetische Veränderungen im Verlauf der Differenzierung besser beurteilen zu können, wurde eine ChIP-Sequenzierung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen (ES) angefertigt und mit den Profilen der zwei Chondrozytenpopulationen verglichen. Die drei Zellpopulationen zeigten zum einen, die erwarteten Histonmodifikations-Profile für Gene, deren Expression bekannt ist und zum anderen, dass die vier aktivierenden Histonmodifikationen zur Identifizierung von exprimierten Genen genutzt werden können. Der Vergleich aller transkriptionell-aktiven Gene von proliferierenden und hypertrophen Chondrozyten, gemessen am simultanen Auftreten aller vier aktivierenden Histonmodifikationen zeigte eine signifikante Steigerung von Chondrozyten-spezifischen Gen Ontologie (GO)-Terms und Signalwegen in proliferierenden Chondrozyten, während in den hypertrophen Zellen Apoptose-Terms und die Zellzyklus Inhibitoren gefunden wurden.

Der Vergleich von Genen, die in proliferierenden, aber nicht in hypertrophen Chondrozyten aktiv sind zeigte, dass die Trimethylierung von H3K27 zur Repression von vorher aktiven Genen dient. Außerdem zeigte eine genaue Analyse der aktivierenden Markierungen, dass die Abschaltung der Expression immer mit der Methylierung von H3K27 beginnt worauf dann die aktivierenden Markierungen sukzessiv abgebaut werden.

Für die Aktivierung von Genen wurden zwei mögliche Mechanismen gefunden. Entweder wurden nur aktivierende Marker oder H3K4me3 in Verbindung mit dem reprimierenden H3K27me3 angereichert, womit die Gensequenz zur Transkription *geprimt* wird und im Folgenden alle anderen aktivierenden Histonmodifikationen akkumulierten.

Die Analyse der H3K27ac-Markierung detektierte eine größere Anzahl an Enhancern in hypertrophen- als in proliferierenden Chondrozyten und ES-Zellen. Dabei waren in hypertrophen Chondrozyten mehr Enhancer als aktive Gene vorhanden. Dies lässt darauf schließen, dass mehrere Enhancer zur Aktivierung eines Genes benötigt werden. Die Lokalisation der Enhancer offenbarte eine Abnahme der Distanz zwischen Enhancer und Gen im Verlauf der Differenzierung. In proliferierenden- und hypertrophen Chondrozyten wurden nur 202 identische Enhancerregionen detektiert, wobei aber für 899 Gene in beiden Populationen ein Enhancer identifiziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die beiden Chondrozyten-Populationen unterschiedliche Enhancerregionen für die Regulation eines Gens nutzen. Interessanterweise zeigte die Korrelation von Enhancern und exprimierten Genen, dass Enhancer bereits in proliferierenden Chondrozyten markiert werden, obwohl das korrespondierende Gen erst in hypertrophen

Chondrozyten aktiviert wird. Zudem trugen die Enhancer auch nach Abschaltung der Gene die H3K27ac-Markierung.

Die gleichzeitige Trimethylierungen von H3K4 und H3K27 (bivalente Markierung) wurden bereits für Gene in ES-Zellen beschrieben, die zur Expression *geprimt* sind. Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von hypertrophen Chondrozyten-spezifischen Genen ebenfalls durch eine bivalente Markierung in proliferierenden Chondrozyten vorbereitet wird. Interessanterweise wurde ein erhöhtes Auftreten der bivalenten Markierung insbesondere in hypertrophen Chondrozyten detektiert. Neben der bekannten Feinregulation durch die bivalente Markierung wurde ein Langzeit-Mechanismus entdeckt, mit dem Entwicklungs-spezifische Gene dauerhaft reprimiert werden. In ES-Zellen und proliferierenden Chondrozyten diente H3K27me3 hauptsächlich der Regulation von bivalenten Genen, jedoch nahm die Anzahl an reprimierten Genen, unabhängig vom bivalenten Marker H3K4me3, im Verlauf der hypertrophen Differenzierung zu, was auf eine neue Funktion von H3K27me3 hinweist. Zusammenfassend konnte mit dieser Arbeit nicht nur die generelle Änderung der Histonmodifikationen während der Chondrozytendifferenzierung nachgewiesen werden, sondern es wurden grundlegende Histonmodifikations-Muster der Transkriptionsregulation entdeckt, die eine fundierte Grundlage für die weitere Forschung bilden.

7 Abstract

Bones of the endochondral skeleton are formed via a cartilage template, which is replaced by bone tissue. To ensure correct bone formation, the differentiation from proliferating into hypertrophic chondrocytes needs to be controlled by a complex network of regulatory molecules. Furthermore, histone deacetylases (Hdacs) have been identified as regulators of chondrocyte differentiation. Data of our lab indicate that chondrocyte specific transcription factors interact with a subset of Hdacs in chondrocytes, thereby regulating their activity (Wuelling et al., 2013). Moreover, we could show that the global histone acetylation status increases during chondrocyte differentiation *in vitro* (Masterthesis Thiesen A.M., 2012).

To receive deeper insight into the functional consequences of alterations in the histone code, epigenetic changes linked to chondrocyte differentiation were analysed. Towards this aim, proliferating and hypertrophic chondrocytes were isolated by FACS (fluorescence activated cell sorting) from transgenic mice, which express yellow fluorescent protein under cell type-specific promoters. A ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) protocol for small cell numbers was established and the chromatin was sequenced. For comprehensive analysis, activating- and repressing histone modifications were investigated. As a marker for transcriptional activation the four activating histone modifications H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, and H3K36me3 were selected, for bivalent genes H3K4me3 together with H3K27me3, for repressed genes H3K9me3 and H3K27me3 and for enhancer detection H3K9ac and H3K27ac (Wang et al., 2008).

The data sets obtained from biological replicates of proliferating and hypertrophic chondrocytes displayed high correlation on read and gene level for each modification. The numbers of peaks for the activating histone marks H3K4me3, H3K9ac, and H3K36me3 were similar in both cell types. In contrast, hypertrophic chondrocytes exhibited a slight increase of the activating mark H3K27ac as well as a dramatic increase of repressive histone trimethylation marks. This indicates a global increase in histone acetylation and trimethylation during chondrocyte development.

To gain insight into the epigenetic changes during cell differentiation, an embryonic stem cell (ES-cell) ChIP was implemented and compared to the two chondrocyte profiles. All three cell populations exhibited the expected histone modification profiles of genes with known expression pattern. Additionally, the comparison showed that all four activating

histone modifications can be used to identify expressed genes. The comparison of activating marks identified chondrocyte-specific Gene Ontology (GO)-terms and signalling pathways in proliferating chondrocytes, as well as apoptotic terms and cell cycle inhibitors in hypertrophic chondrocytes.

The analysis of genes, which were active in proliferating but not in hypertrophic chondrocytes revealed that H3K27me3 serves for the repression of genes. Furthermore, the detailed analysis of activating marks indicated that the termination of transcription always begins with the methylation of H3K27me3 followed by a gradual downregulation of the activating marks. For activation, two possible mechanisms were detected: On the one hand only activating histone modifications were increased. On the other hand, a combination of the activating mark H3K4me3 and the repressing mark H3K27me3 primed the gene, before further activating marks were enriched.

For further analysis, active enhancers were detected by comparing H3K27ac and H3K9ac profiles. This revealed a high quantity of enhancers in hypertrophic chondrocytes in contrast to the number of active genes, suggesting that several enhancers are required for the activation of a single gene. In addition, the determination of enhancer locations indicated that the distance between gene and enhancer decreases during differentiation. Proliferating and hypertrophic chondrocytes shared only 202 identical enhancer regions, although 899 identical genes were activated through enhancers. This indicates that the two chondrocyte populations use different enhancer regions to regulate the same genes. Interestingly, the correlation of enhancers and active genes revealed that enhancers were already marked with H3K27ac in proliferating chondrocytes whereas the corresponding genes were first expressed in hypertrophic chondrocytes. Moreover, enhancers were still marked after transcriptional termination.

The simultaneous appearance of H3K4me3 and H3K27me3 (bivalent mark) is known to prime genes for expression in ES-cells. In this thesis, the bivalent modifications also prime genes in proliferating chondrocytes for the expression in hypertrophic chondrocytes. Unexpectedly, our findings revealed a high abundance of bivalent genes in hypertrophic chondrocytes. In addition, our data indicate that bivalent gene regulation is not only fine-tuning gene activity but also acts as a long-term mechanism for the inactivation of developmental genes during cell differentiation. The analysis of all three cell types revealed an increase of bivalent genes during hypertrophic differentiation. In ES-cells and proliferating chondrocytes, H3K27me3 was required mainly for bivalent gene regulation. Beyond this, the number of repressed genes with H3K27me3 marks increased from

proliferating to hypertrophic chondrocytes, independent of the bivalent marker H3K4me3, which indicates a new function of H3K27me3 during chondrocyte development.

In conclusion, this work not only gives new insight into the changes in histone modification during the process of chondrocyte differentiation, but also detects new, general histone modification patterns linked to the regulation of transcription in differentiated cell types. These findings provide a promising basis for further research.

8 Literaturverzeichnis

- Adam, R.C., Yang, H., Rockowitz, S., Larsen, S.B., Nikolova, M., Oristian, D.S., Polak, L., Kadaja, M., Asare, A., Zheng, D., Fuchs, E., 2015.** Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. *Nature* 521, 366-370.
- Ahn, S.H., Kim, M., Buratowski, S., 2004.** Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Mol Cell* 13, 67-76.
- Akiyama, H., Kim, J.E., Nakashima, K., Balmes, G., Iwai, N., Deng, J.M., Zhang, Z., Martin, J.F., Behringer, R.R., Nakamura, T., de Crombrughe, B., 2005.** Osteochondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14665-14670.
- Akiyama, H., Lefebvre, V., 2011.** Unraveling the transcriptional regulatory machinery in chondrogenesis. *J Bone Miner Metab* 29, 390-395.
- Alder, O., Laval, F., Helness, A., Brookes, E., Pinho, S., Chandrashekrana, A., Arnaud, P., Pombo, A., O'Neill, L., Azuara, V., 2010.** Ring1B and Suv39h1 delineate distinct chromatin states at bivalent genes during early mouse lineage commitment. *Development* 137, 2483-2492.
- Aloia, L., Di Stefano, B., Di Croce, L., 2013.** Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development* 140, 2525-2534.
- Arnold, M.A., Kim, Y., Czubryt, M.P., Phan, D., McAnally, J., Qi, X., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R., Olson, E.N., 2007.** MEF2C transcription factor controls chondrocyte hypertrophy and bone development. *Dev Cell* 12, 377-389.
- Arnoult, N., Van Beneden, A., Decottignies, A., 2012.** Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1alpha. *Nat Struct Mol Biol* 19, 948-956.
- Bannister, A.J., Schneider, R., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., Kouzarides, T., 2005.** Spatial distribution of di- and tri-methyl lysine 36 of histone H3 at active genes. *J Biol Chem* 280, 17732-17736.
- Barth, T.K., Imhof, A., 2010.** Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem Sci* 35, 618-626.
- Bau, B., Gebhard, P.M., Haag, J., Knorr, T., Bartnik, E., Aigner, T., 2002.** Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum* 46, 2648-2657.
- Bedford, D.C., Kasper, L.H., Fukuyama, T., Brindle, P.K., 2010.** Target gene context influences the transcriptional requirement for the KAT3 family of CBP and p300 histone acetyltransferases. *Epigenetics* 5, 9-15.
- Bernstein, B.E., Kamal, M., Lindblad-Toh, K., Bekiranov, S., Bailey, D.K., Huebert, D.J., McMahon, S., Karlsson, E.K., Kulbokas, E.J., 3rd, Gingeras, T.R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2005.** Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell* 120, 169-181.
- Bernstein, B.E., Mikkelsen, T.S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D.J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., Jaenisch, R., Wagschal, A., Feil, R., Schreiber, S.L., Lander, E.S., 2006.** A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315-326.
- Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., 1999.** Sox9 is required for cartilage formation. *Nat Genet* 22, 85-89.

- Bilodeau, S., Kagey, M.H., Frampton, G.M., Rahl, P.B., Young, R.A., 2009.** SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state. *Genes Dev* 23, 2484-2489.
- Boros, J., Arnoult, N., Stroobant, V., Collet, J.F., Decottignies, A., 2014.** Polycomb repressive complex 2 and H3K27me3 cooperate with H3K9 methylation to maintain heterochromatin protein 1alpha at chromatin. *Mol Cell Biol* 34, 3662-3674.
- Boyer, L.A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L.A., Lee, T.I., Levine, S.S., Wernig, M., Tajonar, A., Ray, M.K., Bell, G.W., Otte, A.P., Vidal, M., Gifford, D.K., Young, R.A., Jaenisch, R., 2006.** Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441, 349-353.
- Bracken, A.P., Dietrich, N., Pasini, D., Hansen, K.H., Helin, K., 2006.** Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20, 1123-1136.
- Bradley, E.W., McGee-Lawrence, M.E., Westendorf, J.J., 2011.** Hdac-mediated control of endochondral and intramembranous ossification. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21, 101-113.
- Calo, E., Wysocka, J., 2013.** Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell* 49, 825-837.
- Campeau, P.M., Kim, J.C., Lu, J.T., Schwartzentruber, J.A., Abdul-Rahman, O.A., Schlaubitz, S., Murdock, D.M., Jiang, M.M., Lammer, E.J., Enns, G.M., Rhead, W.J., Rowland, J., Robertson, S.P., Cormier-Daire, V., Bainbridge, M.N., Yang, X.J., Gingras, M.C., Gibbs, R.A., Rosenblatt, D.S., Majewski, J., Lee, B.H., 2012.** Mutations in KAT6B, encoding a histone acetyltransferase, cause Genitopatellar syndrome. *Am J Hum Genet* 90, 282-289.
- Chen, Y., Jorgensen, M., Kolde, R., Zhao, X., Parker, B., Valen, E., Wen, J., Sandelin, A., 2011.** Prediction of RNA Polymerase II recruitment, elongation and stalling from histone modification data. *BMC Genomics* 12, 544.
- Clarkin, C., Olsen, B.R., 2010.** On bone-forming cells and blood vessels in bone development. *Cell Metab* 12, 314-316.
- Coqueret, O., 2003.** New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment? *Trends Cell Biol* 13, 65-70.
- Cotney, J., Leng, J., Oh, S., DeMare, L.E., Reilly, S.K., Gerstein, M.B., Noonan, J.P., 2012.** Chromatin state signatures associated with tissue-specific gene expression and enhancer activity in the embryonic limb. *Genome Res* 22, 1069-1080.
- Creyghton, M.P., Cheng, A.W., Welstead, G.G., Kooistra, T., Carey, B.W., Steine, E.J., Hanna, J., Lodato, M.A., Frampton, G.M., Sharp, P.A., Boyer, L.A., Young, R.A., Jaenisch, R., 2010.** Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 21931-21936.
- Cui, K., Zang, C., Roh, T.Y., Schones, D.E., Childs, R.W., Peng, W., Zhao, K., 2009.** Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 4, 80-93.
- D'Amico, L.A., Boujard, D., Coumailleau, P., 2013.** The neurogenic factor NeuroD1 is expressed in post-mitotic cells during juvenile and adult *Xenopus* neurogenesis and not in progenitor or radial glial cells. *PLoS One* 8, e66487.
- Day, D.J., Speiser, P.W., Schulze, E., Bettendorf, M., Fitness, J., Barany, F., White, P.C., 1996.** Identification of non-amplifying CYP21 genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees. *Hum Mol Genet* 5, 2039-2048.

- de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B., 2003.** Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370, 737-749.
- Denis, M., Bissonnette, R., Haidar, B., Krimbou, L., Bouvier, M., Genest, J., 2003.** Expression, regulation, and activity of ABCA1 in human cell lines. *Mol Genet Metab* 78, 265-274.
- Dy, P., Wang, W., Bhattaram, P., Wang, Q., Wang, L., Ballock, R.T., Lefebvre, V., 2012.** Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. *Dev Cell* 22, 597-609.
- Edmunds, J.W., Mahadevan, L.C., Clayton, A.L., 2008.** Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *EMBO J* 27, 406-420.
- Elmore, S., 2007.** Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Escamilla-Del-Arenal, M., da Rocha, S.T., Spruijt, C.G., Masui, O., Renaud, O., Smits, A.H., Margueron, R., Vermeulen, M., Heard, E., 2013.** Cdy1, a new partner of the inactive X chromosome and potential reader of H3K27me3 and H3K9me2. *Mol Cell Biol* 33, 5005-5020.
- Fuchs, S.M., Kizer, K.O., Braberg, H., Krogan, N.J., Strahl, B.D., 2012.** RNA polymerase II carboxyl-terminal domain phosphorylation regulates protein stability of the Set2 methyltransferase and histone H3 di- and trimethylation at lysine 36. *J Biol Chem* 287, 3249-3256.
- Gao, B., Hu, J., Stricker, S., Cheung, M., Ma, G., Law, K.F., Witte, F., Briscoe, J., Mundlos, S., He, L., Cheah, K.S., Chan, D., 2009.** A mutation in *Ihh* that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range. *Nature* 458, 1196-1200.
- Gardner, E., O'Rahilly, R., 1968.** The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 102, 289-299.
- Gebhard, S., Hattori, T., Bauer, E., Schlund, B., Bosl, M.R., de Crombrughe, B., von der Mark, K., 2008.** Specific expression of Cre recombinase in hypertrophic cartilage under the control of a BAC-Col10a1 promoter. *Matrix Biol* 27, 693-699.
- Geisler, S.J., Paro, R., 2015.** Trithorax and Polycomb group-dependent regulation: a tale of opposing activities. *Development* 142, 2876-2887.
- Gross, S., Krause, Y., Wuelling, M., Vortkamp, A., 2012.** Hoxa11 and Hoxd11 regulate chondrocyte differentiation upstream of Runx2 and Shox2 in mice. *PLoS One* 7, e43553.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., Young, R.A., 2007.** A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Han, Y., Lefebvre, V., 2008.** L-Sox5 and Sox6 drive expression of the aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox9 to a far-upstream enhancer. *Mol Cell Biol* 28, 4999-5013.
- Hanley, N.A., Hagan, D.M., Clement-Jones, M., Ball, S.G., Strachan, T., Salas-Cortes, L., McElreavey, K., Lindsay, S., Robson, S., Bullen, P., Ostrer, H., Wilson, D.I., 2000.** SRY, SOX9, and DAX1 expression patterns during human sex determination and gonadal development. *Mech Dev* 91, 403-407.
- Hansen, K.H., Bracken, A.P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S.S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., Helin, K., 2008.** A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat Cell Biol* 10, 1291-1300.
- Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Whitson, R.H., Nishimura, R.,**

- Yoneda, T.**, 2013. Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. *Nat Commun* 4, 2850.
- Hatori, M., Klatte, K.J., Teixeira, C.C., Shapiro, I.M.**, 1995. End labeling studies of fragmented DNA in the avian growth plate: evidence of apoptosis in terminally differentiated chondrocytes. *J Bone Miner Res* 10, 1960-1968.
- Herlofsen, S.R., Bryne, J.C., Hoiby, T., Wang, L., Issner, R., Zhang, X., Coyne, M.J., Boyle, P., Gu, H., Meza-Zepeda, L.A., Collas, P., Mikkelsen, T.S., Brinchmann, J.E.**, 2013. Genome-wide map of quantified epigenetic changes during in vitro chondrogenic differentiation of primary human mesenchymal stem cells. *BMC Genomics* 14, 105.
- Higashiyama, R., Miyaki, S., Yamashita, S., Yoshitaka, T., Lindman, G., Ito, Y., Sasho, T., Takahashi, K., Lotz, M., Asahara, H.**, 2010. Correlation between MMP-13 and HDAC7 expression in human knee osteoarthritis. *Mod Rheumatol* 20, 11-17.
- Holwerda, S.J., de Laat, W.**, 2013. CTCF: the protein, the binding partners, the binding sites and their chromatin loops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20120369.
- Hong, S., Derfoul, A., Pereira-Mouries, L., Hall, D.J.**, 2009. A novel domain in histone deacetylase 1 and 2 mediates repression of cartilage-specific genes in human chondrocytes. *FASEB J* 23, 3539-3552.
- Huh, Y.H., Ryu, J.H., Chun, J.S.**, 2007. Regulation of type II collagen expression by histone deacetylase in articular chondrocytes. *J Biol Chem* 282, 17123-17131.
- Ideno, H., Shimada, A., Imaizumi, K., Kimura, H., Abe, M., Nakashima, K., Nifuji, A.**, 2013. Predominant expression of H3K9 methyltransferases in prehypertrophic and hypertrophic chondrocytes during mouse growth plate cartilage development. *Gene Expr Patterns* 13, 84-90.
- Infante, C.R., Mihala, A.G., Park, S., Wang, J.S., Johnson, K.K., Lauderdale, J.D., Menke, D.B.**, 2015. Shared Enhancer Activity in the Limbs and Phallus and Functional Divergence of a Limb-Genital cis-Regulatory Element in Snakes. *Dev Cell* 35, 107-119.
- Jin, Q., Yu, L.R., Wang, L., Zhang, Z., Kasper, L.H., Lee, J.E., Wang, C., Brindle, P.K., Dent, S.Y., Ge, K.**, 2011. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J* 30, 249-262.
- Johnsen, J.M., Nickerson, D.A., Reiner, A.P.**, 2013. Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood* 122, 3268-3275.
- Karlic, R., Chung, H.R., Lasserre, J., Vlahovicek, K., Vingron, M.**, 2010. Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2926-2931.
- Karmodiya, K., Krebs, A.R., Oulad-Abdelghani, M., Kimura, H., Tora, L.**, 2012. H3K9 and H3K14 acetylation co-occur at many gene regulatory elements, while H3K14ac marks a subset of inactive inducible promoters in mouse embryonic stem cells. *BMC Genomics* 13, 424.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., Zhang, Y.**, 2006. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7, 715-727.
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., Ahringer, J.**, 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat Genet* 41, 376-381.
- Kozarewa, I., Ning, Z., Quail, M.A., Sanders, M.J., Berriman, M., Turner, D.J.**, 2009. Amplification-free Illumina sequencing-library preparation facilitates improved mapping and assembly of (G+C)-biased genomes. *Nat Methods* 6, 291-295.
- Kozhemyakina, E., Cohen, T., Yao, T.P., Lassar, A.B.**, 2009. Parathyroid hormone-related peptide represses chondrocyte hypertrophy through a protein

- phosphatase 2A/histone deacetylase 4/MEF2 pathway. *Mol Cell Biol* 29, 5751-5762.
- Krakow, D., Rimoin, D.L.**, 2010. The skeletal dysplasias. *Genet Med* 12, 327-341.
- LaBaer, J., Garrett, M.D., Stevenson, L.F., Slingerland, J.M., Sandhu, C., Chou, H.S., Fattaey, A., Harlow, E.**, 1997. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 11, 847-862.
- Lagger, G., O'Carroll, D., Rembold, M., Khier, H., Tischler, J., Weitzer, G., Schuettengruber, B., Hauser, C., Brunmeir, R., Jenuwein, T., Seiser, C.**, 2002. Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 21, 2672-2681.
- Lee, N.K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J.D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P.J., McKee, M.D., Jung, D.Y., Zhang, Z., Kim, J.K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P., Karsenty, G.**, 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469.
- Lefebvre, V., Bhattaram, P.**, 2010. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 90, 291-317.
- Lefebvre, V., Li, P., de Crombrughe, B.**, 1998. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *EMBO J* 17, 5718-5733.
- Li, H., Rauch, T., Chen, Z.X., Szabo, P.E., Riggs, A.D., Pfeifer, G.P.**, 2006. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. *J Biol Chem* 281, 19489-19500.
- Li, H., Xie, H., Liu, W., Hu, R., Huang, B., Tan, Y.F., Xu, K., Sheng, Z.F., Zhou, H.D., Wu, X.P., Luo, X.H.**, 2009. A novel microRNA targeting HDAC5 regulates osteoblast differentiation in mice and contributes to primary osteoporosis in humans. *J Clin Invest* 119, 3666-3677.
- Li, Q., Peterson, K.R., Fang, X., Stamatoyannopoulos, G.**, 2002. Locus control regions. *Blood* 100, 3077-3086.
- Liu, C.F., Lefebvre, V.**, 2015. The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis. *Nucleic Acids Res* 43, 8183-8203.
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., Kronenberg, H.M.**, 2010. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell* 19, 329-344.
- Mandal, N.A., Tran, J.T., Saadi, A., Rahman, A.K., Huynh, T.P., Klein, W.H., Cho, J.H.**, 2013. Expression and localization of CERKL in the mammalian retina, its response to light-stress, and relationship with NeuroD1 gene. *Exp Eye Res* 106, 24-33.
- Metzker, M.L.**, 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31-46.
- Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C., Horikawa, I.**, 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 16, 4623-4635.
- Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.K., Koche, R.P., Lee, W., Mendenhall, E., O'Donovan, A., Presser, A., Russ, C., Xie, X., Meissner, A., Wernig, M., Jaenisch, R., Nusbaum, C., Lander, E.S., Bernstein, B.E.**, 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553-560.

- Minina, E., Kreschel, C., Naski, M.C., Ornitz, D.M., Vortkamp, A., 2002.** Interaction of FGF, Ihh/Pthlh, and BMP signaling integrates chondrocyte proliferation and hypertrophic differentiation. *Dev Cell* 3, 439-449.
- Miyazaki, H., Higashimoto, K., Yada, Y., Endo, T.A., Sharif, J., Komori, T., Matsuda, M., Koseki, Y., Nakayama, M., Soejima, H., Handa, H., Koseki, H., Hirose, S., Nishioka, K., 2013.** Ash1l methylates Lys36 of histone H3 independently of transcriptional elongation to counteract polycomb silencing. *PLoS Genet* 9, e1003897.
- Mokry, M., Hatzis, P., de Bruijn, E., Koster, J., Versteeg, R., Schuijers, J., van de Wetering, M., Guryev, V., Clevers, H., Cuppen, E., 2010.** Efficient double fragmentation ChIP-seq provides nucleotide resolution protein-DNA binding profiles. *PLoS One* 5, e15092.
- Montavon, T., Soshnikova, N., Mascrez, B., Joye, E., Thevenet, L., Splinter, E., de Laat, W., Spitz, F., Duboule, D., 2011.** A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell* 147, 1132-1145.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., Owen, M.J., Mertelsmann, R., Zabel, B.U., Olsen, B.R., 1997.** Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89, 773-779.
- Nakayama, K., Nakayama, K., 1998.** Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors: brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays* 20, 1020-1029.
- Negishi, Y., Ui, N., Nakajima, M., Kawashima, K., Maruyama, K., Takizawa, T., Endo, H., 2001.** p21Cip-1/SDI-1/WAF-1 gene is involved in chondrogenic differentiation of ATDC5 cells in vitro. *J Biol Chem* 276, 33249-33256.
- Nord, A.S., Blow, M.J., Attanasio, C., Akiyama, J.A., Holt, A., Hosseini, R., Phouanavong, S., Plajzer-Frick, I., Shoukry, M., Afzal, V., Rubenstein, J.L., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A., Visel, A., 2013.** Rapid and pervasive changes in genome-wide enhancer usage during mammalian development. *Cell* 155, 1521-1531.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., Weinert, T.A., 2002.** Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* 36, 617-656.
- Ohba, S., He, X., Hojo, H., McMahon, A.P., 2015.** Distinct Transcriptional Programs Underlie Sox9 Regulation of the Mammalian Chondrocyte. *Cell Rep* 12, 229-243.
- Otto, F., Kanegane, H., Mundlos, S., 2002.** Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia. *Hum Mutat* 19, 209-216.
- Ovchinnikov, D.A., Deng, J.M., Ogunrinu, G., Behringer, R.R., 2000.** Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. *Genesis* 26, 145-146.
- Park, P.J., 2009.** ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nat Rev Genet* 10, 669-680.
- Parker, S.B., Eichele, G., Zhang, P., Rawls, A., Sands, A.T., Bradley, A., Olson, E.N., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1995.** p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267, 1024-1027.
- Pauler, F.M., Sloane, M.A., Huang, R., Regha, K., Koerner, M.V., Tamir, I., Sommer, A., Aszodi, A., Jenuwein, T., Barlow, D.P., 2009.** H3K27me3 forms BLOCs over silent genes and intergenic regions and specifies a histone banding pattern on a mouse autosomal chromosome. *Genome Res* 19, 221-233.
- Peters, A.H., O'Carroll, D., Scherthan, H., Mechtler, K., Sauer, S., Schofer, C., Weipoltshammer, K., Pagani, M., Lachner, M., Kohlmaier, A., Opravil, S., Doyle,**

- M., Sibilia, M., Jenuwein, T.**, 2001. Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323-337.
- Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., Young, R.A.**, 2005. Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122, 517-527.
- Poole, A.R., Rizkalla, G., Ionescu, M., Reiner, A., Brooks, E., Rorabeck, C., Bourne, R., Bogoch, E.**, 1993. Osteoarthritis in the human knee: a dynamic process of cartilage matrix degradation, synthesis and reorganization. *Agents Actions Suppl* 39, 3-13.
- Quarles, L.D.**, 2008. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest* 118, 3820-3828.
- Razidlo, D.F., Whitney, T.J., Casper, M.E., McGee-Lawrence, M.E., Stensgard, B.A., Li, X., Secreto, F.J., Knutson, S.K., Hiebert, S.W., Westendorf, J.J.**, 2010. Histone deacetylase 3 depletion in osteo/chondroprogenitor cells decreases bone density and increases marrow fat. *PLoS One* 5, e11492.
- Roach, H.I., Aigner, T., Soder, S., Haag, J., Welkerling, H.**, 2007. Pathobiology of osteoarthritis: Pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Curr Drug Targets* 8, 271-282.
- Roach, H.I., Erenpreisa, J., Aigner, T.**, 1995. Osteogenic differentiation of hypertrophic chondrocytes involves asymmetric cell divisions and apoptosis. *J Cell Biol* 131, 483-494.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., Evans, M.**, 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Roth, S.Y., Denu, J.M., Allis, C.D.**, 2001. Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70, 81-120.
- Rozowsky, J., Euskirchen, G., Auerbach, R.K., Zhang, Z.D., Gibson, T., Bjornson, R., Carriero, N., Snyder, M., Gerstein, M.B.**, 2009. PeakSeq enables systematic scoring of ChIP-seq experiments relative to controls. *Nat Biotechnol* 27, 66-75.
- Savarirayan, R., Rimoin, D.L.**, 2002. The skeletal dysplasias. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 16, 547-560.
- Schmitges, F.W., Prusty, A.B., Faty, M., Stutzer, A., Lingaraju, G.M., Aiwazian, J., Sack, R., Hess, D., Li, L., Zhou, S., Bunker, R.D., Wirth, U., Bouwmeester, T., Bauer, A., Ly-Hartig, N., Zhao, K., Chan, H., Gu, J., Gut, H., Fischle, W., Muller, J., Thoma, N.H.**, 2011. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell* 42, 330-341.
- Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., Kouzarides, T.**, 2004. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol* 6, 73-77.
- Schuettengruber, B., Martinez, A.M., Iovino, N., Cavalli, G.**, 2011. Trithorax group proteins: switching genes on and keeping them active. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 799-814.
- Schwarz, D., Varum, S., Zemke, M., Scholer, A., Baggiolini, A., Draganova, K., Koseki, H., Schubeler, D., Sommer, L.**, 2014. Ezh2 is required for neural crest-derived cartilage and bone formation. *Development* 141, 867-877.
- Scott, C.E., Wynn, S.L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gomez Gavero, M.V., Booth, S., Gao, B., Cheah, K.S., Lovell-Badge, R., Briscoe, J.**, 2010. SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat Neurosci* 13, 1181-1189.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M.**, 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.

- Smith, N., Dong, Y., Lian, J.B., Pratap, J., Kingsley, P.D., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Schwarz, E.M., O'Keefe, R.J., Stein, G.S., Drissi, M.H., 2005.** Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development. *J Cell Physiol* 203, 133-143.
- Soriano, P., 1999.** Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 21, 70-71.
- Squazzo, S.L., O'Geen, H., Komashko, V.M., Krig, S.R., Jin, V.X., Jang, S.W., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R., Farnham, P.J., 2006.** Suz12 binds to silenced regions of the genome in a cell-type-specific manner. *Genome Res* 16, 890-900.
- St-Jacques, B., Hammerschmidt, M., McMahon, A.P., 1999.** Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 13, 2072-2086.
- Steffen, P.A., Ringrose, L., 2014.** What are memories made of? How Polycomb and Trithorax proteins mediate epigenetic memory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 340-356.
- Stewart, M.C., Farnum, C.E., MacLeod, J.N., 1997.** Expression of p21CIP1/WAF1 in chondrocytes. *Calcif Tissue Int* 61, 199-204.
- Stricker, S., Fundele, R., Vortkamp, A., Mundlos, S., 2002.** Role of Runx genes in chondrocyte differentiation. *Dev Biol* 245, 95-108.
- Takeda, S., Bonnamy, J.P., Owen, M.J., Ducy, P., Karsenty, G., 2001.** Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15, 467-481.
- Teytelman, L., Ozaydin, B., Zill, O., Lefrancois, P., Snyder, M., Rine, J., Eisen, M.B., 2009.** Impact of chromatin structures on DNA processing for genomic analyses. *PLoS One* 4, e6700.
- Trivedi, C.M., Luo, Y., Yin, Z., Zhang, M., Zhu, W., Wang, T., Floss, T., Goettlicher, M., Noppinger, P.R., Wurst, W., Ferrari, V.A., Abrams, C.S., Gruber, P.J., Epstein, J.A., 2007.** Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med* 13, 324-331.
- Troeberg, L., Nagase, H., 2012.** Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1824, 133-145.
- Tsang, K.Y., Chan, D., Cheah, K.S., 2015.** Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension? *Dev Growth Differ* 57, 179-192.
- Tu, S., Bulloch, E.M., Yang, L., Ren, C., Huang, W.C., Hsu, P.H., Chen, C.H., Liao, C.L., Yu, H.M., Lo, W.S., Freitas, M.A., Tsai, M.D., 2007.** Identification of histone demethylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282, 14262-14271.
- Vega, R.B., Matsuda, K., Oh, J., Barbosa, A.C., Yang, X., Meadows, E., McAnally, J., Pomajzl, C., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Karsenty, G., Olson, E.N., 2004.** Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119, 555-566.
- Visel, A., Rubin, E.M., Pennacchio, L.A., 2009.** Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* 461, 199-205.
- Voigt, P., Tee, W.W., Reinberg, D., 2013.** A double take on bivalent promoters. *Genes Dev* 27, 1318-1338.
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F.D., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W., Scherer, G., 1994.** Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and around the Sry-Related Gene Sox9. *Cell* 79, 1111-1120.
- Wamstad, J.A., Alexander, J.M., Truty, R.M., Shrikumar, A., Li, F., Eilertson, K.E., Ding, H., Wylie, J.N., Pico, A.R., Capra, J.A., Erwin, G., Kattman, S.J., Keller, G.M.,**

- Srivastava, D., Levine, S.S., Pollard, K.S., Holloway, A.K., Boyer, L.A., Bruneau, B.G.,** 2012. Dynamic and coordinated epigenetic regulation of developmental transitions in the cardiac lineage. *Cell* 151, 206-220.
- Wang, Z., Zang, C., Rosenfeld, J.A., Schones, D.E., Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Peng, W., Zhang, M.Q., Zhao, K.,** 2008. Combinatorial patterns of histone acetylations and methylations in the human genome. *Nat Genet* 40, 897-903.
- Whyte, W.A., Orlando, D.A., Hnisz, D., Abraham, B.J., Lin, C.Y., Kagey, M.H., Rahl, P.B., Lee, T.I., Young, R.A.,** 2013. Master transcription factors and mediator establish super-enhancers at key cell identity genes. *Cell* 153, 307-319.
- Wilkin, D.J., Szabo, J.K., Cameron, R., Henderson, S., Bellus, G.A., Mack, M.L., Kaitila, I., Loughlin, J., Munnich, A., Sykes, B., Bonaventure, J., Francomano, C.A.,** 1998. Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet* 63, 711-716.
- Williams, S.R., Aldred, M.A., Der Kaloustian, V.M., Halal, F., Gowans, G., McLeod, D.R., Zondag, S., Toriello, H.V., Magenis, R.E., Elsea, S.H.,** 2010. Haploinsufficiency of HDAC4 causes brachydactyly mental retardation syndrome, with brachydactyly type E, developmental delays, and behavioral problems. *Am J Hum Genet* 87, 219-228.
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., Koopman, P.,** 1995. The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* 9, 15-20.
- Wuelling, M., Pasdziernik, M., Moll, C.N., Thiesen, A.M., Schneider, S., Johannes, C., Vortkamp, A.,** 2013. The multi zinc-finger protein Trps1 acts as a regulator of histone deacetylation during mitosis. *Cell Cycle* 12, 2219-2232.
- Wuelling, M., Vortkamp, A.,** 2010. Transcriptional networks controlling chondrocyte proliferation and differentiation during endochondral ossification. *Pediatr Nephrol* 25, 625-631.
- Xu, S., Grullon, S., Ge, K., Peng, W.,** 2014. Spatial clustering for identification of ChIP-enriched regions (SICER) to map regions of histone methylation patterns in embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 1150, 97-111.
- Yang, G., Cui, F., Hou, N., Cheng, X., Zhang, J., Wang, Y., Jiang, N., Gao, X., Yang, X.,** 2005. Transgenic mice that express Cre recombinase in hypertrophic chondrocytes. *Genesis* 42, 33-36.
- Yang, L., Lawson, K.A., Teteak, C.J., Zou, J., Hacquebord, J., Patterson, D., Ghatan, A.C., Mei, Q., Zielinska-Kwiatkowska, A., Bain, S.D., Fernandes, R.J., Chansky, H.A.,** 2013. ESET histone methyltransferase is essential to hypertrophic differentiation of growth plate chondrocytes and formation of epiphyseal plates. *Dev Biol* 380, 99-110.
- Yang, L., Tsang, K.Y., Tang, H.C., Chan, D., Cheah, K.S.,** 2014. Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 12097-12102.
- Yang, W.M., Tsai, S.C., Wen, Y.D., Fejer, G., Seto, E.,** 2002. Functional domains of histone deacetylase-3. *J Biol Chem* 277, 9447-9454.
- Yin, T., Li, L.,** 2006. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116, 1195-1201.
- Yoshida, C.A., Yamamoto, H., Fujita, T., Furuichi, T., Ito, K., Inoue, K., Yamana, K., Zanma, A., Takada, K., Ito, Y., Komori, T.,** 2004. Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev* 18, 952-963.

- Young, D.A., Lakey, R.L., Pennington, C.J., Jones, D., Kevorkian, L., Edwards, D.R., Cawston, T.E., Clark, I.M., 2005.** Histone deacetylase inhibitors modulate metalloproteinase gene expression in chondrocytes and block cartilage resorption. *Arthritis Res Ther* 7, R503-512.
- Young, M.D., Willson, T.A., Wakefield, M.J., Trounson, E., Hilton, D.J., Blewitt, M.E., Oshlack, A., Majewski, I.J., 2011.** ChIP-seq analysis reveals distinct H3K27me3 profiles that correlate with transcriptional activity. *Nucleic Acids Res* 39, 7415-7427.
- Zentner, G.E., Tesar, P.J., Scacheri, P.C., 2011.** Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome Res* 21, 1273-1283.
- Zhang, F., Xu, L., Xu, L., Xu, Q., Li, D., Yang, Y., Karsenty, G., Chen, C.D., 2015.** JMJD3 promotes chondrocyte proliferation and hypertrophy during endochondral bone formation in mice. *J Mol Cell Biol* 7, 23-34.
- Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., Liu, X.S., 2008.** Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* 9, R137.
- Zhao, Q., Eberspaecher, H., Lefebvre, V., De Crombrughe, B., 1997.** Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 209, 377-386.
- Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., Lee, B., 2006.** Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19004-19009.
- Zhou, X., von der Mark, K., Henry, S., Norton, W., Adams, H., de Crombrughe, B., 2014.** Chondrocytes transdifferentiate into osteoblasts in endochondral bone during development, postnatal growth and fracture healing in mice. *PLoS Genet* 10, e1004820.

Zusatz:

Pilu G, Nicolaides K, Ximenes R, Jeanty P. Handbook of Fetal Abnormalitis: Fetal Skeleton

<http://sonoworld.com/client/fetus/html/chapter-09/skeleton.html2000>

9 Anhang

Anhang DVD:

1. Alignment Reports
2. Pearson Korrelation
3. Peak-Detektionen
4. Verrechnungen aktivierender Histonmodifikationen
5. Bivalente Gene
6. Enhancer

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Vortkamp, die mir erst die Anfertigung meiner Doktorarbeit in Ihrer Abteilung für Entwicklungsbiologie ermöglichte.

Dabei möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung sowie für die Diskussionen und Anregungen für meine Arbeit bedanken.

Meinen außerordentlichen Dank geht an Dr. Manuela Wülling. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest und meine Arbeit mit Rat und Tat unterstützt hast. Danke, für die zahlreichen konstruktiven Diskussionen, das gemeinsame Leiden und Erfreuen an allen Aspekten der Wissenschaft und für den ständigen Zugriff auf Manupedia!

Einen großen Dank geht an alle meine Kollegen und ehemaligen Kollegen, die TRPS1-Gang und die Zuckerketten-Fraktion, die immer Hilfsbereit waren und ein lustiges und schönes Arbeitsklima geschaffen haben.

Elke Neiße möchte ich im Besondern danken für die zahlreichen netten Stunden der Mäusepräparationen.

Mein allergrößter Dank geht an alle meine Freunde und meine Familie, die das alles mit mir durchlebt haben!

Publikationen

Wuelling, M., Pasziernik, M., Moll, C.N., **Thiesen, A.M.**, Schneider, S., Johannes, C. and Vortkamp, A. (2013). The multi zinc-finger protein Trps1 acts as a regulator of histone deacetylation during mitosis. *Cell Cycle* 12:14, 2219–2232.

Poster

Thiesen, A.M. et al., 2013. Epigenetic regulation of chondrocyte differentiation due to histone modification. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 „Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung“, Ostbevern, Deutschland

Thiesen, A.M. et al., 2014. Epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 „Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung“, Mülheim a. d. Ruhr, Deutschland

Thiesen, A.M. et al., 2015. Epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. Retreat des Graduiertenkollegs 1431 „Transkriptionskontrolle, Chromatinstruktur und DNA Reparatur in Entwicklung und Differenzierung“, Essen, Deutschland

Vorträge

Thiesen, A.M. (2013) Analysis of epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. Institutsseminar am Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

Thiesen, A.M. (2015) Analysis of epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. Institutsseminar am Zentrum für Medizinische Biotechnologie, Universität Duisburg-Essen, Essen, Deutschland

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Epigenetische Regulation der Chondrozytendifferenzierung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Andrea Thiesen befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____

(Prof. Dr. Andrea Vortkamp)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) c) und e) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den _____

(Andrea Thiesen)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) und f) der Promotionsordnung der Fakultäten für Biologie, Chemie und Mathematik zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____

(Andrea Thiesen)